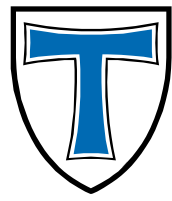


JUSTUS-LIEBIG-



**UNIVERSITÄT
GIESSEN**

In Zusammenarbeit mit dem
Rudolf-Buchheim-Institut
für Pharmakologie

Chromatinfaktoren und Mechanismen der Interleukin-1-abhängigen Genregulation

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

angefertigt am Fachbereich für Biologie und Chemie

vorgelegt von Dipl. Biologin Johanna Sölch
Gießen, 2015

1. Gutachter: Prof.Dr. Reinhard Dammann (JLU Gießen)
2. Gutachter: Prof.Dr.med. Michael Kracht (JLU Gießen)

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung/ <i>Summary</i>	6
1.1 Zusammenfassung	6
1.2 <i>Summary</i>	7
2 Einleitung	9
2.1 Zytokine und die Entzündungsantwort	9
2.2 Die Interleukin (IL)-1 Familie	9
2.3 IL-1-induzierbare Signalwege	11
2.4 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	13
2.5 Chemokine als typische IL-1 Zielgene.....	15
2.6 Regulation von NF- κ B Zielgenen auf der Ebene des Chromatins	16
2.7 Der Transkriptionsregulator Sin3a	19
2.8 Ziele der Arbeit	23
3 Material	25
3.1 Geräte	25
3.2 Chemikalien	26
3.3 Puffer und Lösungen	26
3.3.1 Puffer für Proteinlyse und Ko-Immunopräzipitation.....	26
3.3.2 Puffer für Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	28
3.3.3 Puffer für SDS-PAGE, Westernblot und Agarose-Gelelektrophorese	29
3.3.4 Puffer für CaPO_4 -Transfektion	30
3.3.5 Medien für Zellkultur und Bakterienkulturen	30
3.4 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien	31
3.5 Enzyme	32
3.6 Inhibitoren	32
3.7 Marker	33
3.8 Plasmide	33
3.9 Real-Time PCR Sonden.....	33
3.10 Oligonukleotide für shRNA-Klonierung und Sequenzierprimer	35
3.11 ChIP Primer	35
3.12 Antikörper	36
3.12.1 Antikörper für ChIP	36
3.12.2 Antikörper für Westernblot.....	37
3.13 Bakterienstämme	38

3.14 Antibiotika	38
3.15 Zelllinien	39
3.16 Rekombinante Proteine	39
4 Methoden.....	40
4.1 Arbeiten mit Bakterien	40
4.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien.....	40
4.1.2 Transformation	40
4.1.3 Dauerkulturen von Bakterien.....	40
4.2 Zellkultur	40
4.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	40
4.2.2 Kultivieren und Passagieren von adhärenen Zellen.....	41
4.2.3 Stimulation und Ernten von Zellen	41
4.2.4 Transfektion	42
4.3 Arbeiten mit RNA und DNA	43
4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren.....	43
4.3.2 Reverse Transkription (RT)	44
4.3.3 Quantitative Real-Time PCR.....	44
4.3.4 mRNA-Expressionsanalyse mittels <i>PreAmp Cells-to-Ct_{TM}</i> Kit	47
4.3.5 mRNA-Expressionsanalyse mittels Microarray	48
4.3.6 Klonierung von shRNA-Vektoren	49
4.3.7 Agarose-Gelelektrophorese	51
4.3.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	51
4.3.9 ChIP-DNA Sequenzierung (ChIP-seq) und bioinformatische Analysen.....	53
4.4 Arbeiten mit Proteinen	54
4.4.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen	54
4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	55
4.4.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli	55
4.4.4 Westernblot.....	56
4.4.5 Ko-Immunopräzipitation	57
4.4.6 “Half-Way” ChIP	57
4.4.7 Säureextraktion von Histonen.....	58
5 Ergebnisse.....	59
5.1 NF- κ B p65 als Masterregulator von IL-1-induzierbaren Promotoren und Enhancern...	59
5.1.1 Vergleich der IL-1- und p65-abhängigen Genexpression in humanen und murinen Zellsystemen	59

5.1.2 Analyse der Rekrutierung von Ko-Faktoren an die <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci im humanen p65 „ <i>loss-of-function</i> “-Modellsystem	61
5.1.3 Einfluss von NF- κ B p65 auf den Histonstatus von IL-1-induzierbaren Promotoren und Enhancern	65
5.1.4 Charakterisierung der apikalen Signalwege der NF- κ B p65-abhängigen Effekte an IL-1-induzierten Promotoren und Enhancern.....	67
5.1.5 Einfluss von c-Fos und JunD auf die IL-1-abhängigen Rekrutierungsereignisse und Enhancer-Formierungen am CXC-Cluster.....	71
5.2 Identifizierung von neuen nukleären Ko-Regulatoren an IL-1-abhängigen Promotoren und Enhancern mittels „ <i>loss-of-function</i> “-Screening in murinen embryonalen Fibroblasten	75
5.2.1 Auswahl der Screening Bedingungen	75
5.2.2 Berechnung und Darstellung von dCt und ddCt Werten zur Identifizierung der stärksten regulatorischen Effekte auf das Zielgen <i>mCxcl2</i>	79
5.2.3 Validierung der Screening Ergebnisse und Untersuchung der Effekte auf weitere IL-1 Zielgene.....	81
5.2.4 Einfluss der Depletion von Sin3a auf die IL-1-induzierbare Genexpression	83
5.3 Bindungsanalysen der im Screening ermittelten Ko-Faktoren an NF- κ B Zielgenen	87
5.3.1 IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a	87
5.3.2 Einfluss von TAK1 und IKK2 auf die Rekrutierung von Sin3a	91
5.3.3 Einfluss von HDACs auf die Sin3a Rekrutierung.....	93
5.3.4 Genomweite Analysen der IL-1-abhängigen Sin3a Chromatinrekrutierung	95
5.4 Untersuchungen zur Interaktion von Sin3a mit NF- κ B p65 und RNA-Polymerase II ..	106
5.4.1 Kinetische Analyse der IL-1-abhängigen Bindungsereignisse an den <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci.....	106
5.4.2 Auswirkungen einer p65 Depletion auf die Sin3a Rekrutierung in humanen HeLa Zellen und murinen embryonalen Fibroblasten	107
5.4.3 Analyse der IL-1-induzierbaren Bindung von p65 und RNA-Pol II in humanen Sin3a- <i>knockdown</i> Zellen.....	109
5.4.4 Untersuchung der Bindungs-Abhängigkeiten mittels „ <i>gain-of-function</i> “ Ansätzen	111
5.4.5 Einfluss der RNA-Pol II Aktivität auf die Rekrutierung von p65 und Sin3a	112
5.4.6 Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Sin3a und p65 bzw. RNA-Pol II	117
6 Diskussion	122
6.1 Charakterisierung von NF- κ B p65 als Masterregulator, der die Bindung weiterer Chromatinfaktoren, die Rekrutierung von RNA-Pol II und die Ausbildung von Histonmodifikationen an IL-1-induzierbaren Promotoren und Enhancern vermittelt.....	122
6.2 Identifizierung neuer Ko-Regulatoren des nukleären IL-1 Signalwegs.....	126

6.3 Sin3a reguliert IL-1-abhängig die Expression von NF-κB Zielgenen	131
7 Anhang.....	139
7.1 Literaturverzeichnis.....	139
7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	150
7.3 shRNA-Verzeichnis der Screening Kandidaten.....	153
7.4 Abkürzungsverzeichnis	153
7.5 PhD Portfolio.....	156
7.6 Publikationen	159
7.7 Danksagung.....	161
7.8 Eidesstattliche Erklärung	162

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Zusammenfassung

Das Zytokin Interleukin (IL)-1 ist ein wichtiger Botenstoff des angeborenen Immunsystems und kann das komplette Spektrum der klinischen Symptome lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen auslösen. Auf zellulärer Ebene reprogrammiert IL-1 über ein Netz an Signalkaskaden die inflammatorische Genexpression im Zellkern. Im Vergleich zu den zytoplasmatischen Signalwegen ist die nukleäre Signalvermittlung allerdings weniger gut verstanden. Neben der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B werden weitere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP-1 Proteine, und Ko-Regulatoren aktiviert und an IL-1-induzierte Zielgene, z.B. an die Loci von Chemokinen rekrutiert, sodass offenbar eine kooperative Regulation der Genexpression stattfindet. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Rolle von NF- κ B p65 an IL-1-induzierten Promotoren und regulatorischen Enhancern näher charakterisiert. Mittels einer Kombination aus *knockdown* Ansätzen, ChIP-PCR und ChIP-seq Experimenten konnte p65 lokal und genomweit eine Funktion als Masterregulator zugeordnet werden. Hierbei fördert p65 nicht nur die H3K27 Acetylierung an bereits vormarkierten Enhancern, wodurch diese weiter aktiviert werden, sondern es ist auch für alle nachfolgenden IL-1-regulierten Bindungsereignisse an Promotoren und Enhancern essentiell. Diese Funktionen von p65 erfordern die katalytische Aktivierung der apikalen zytoplasmatischen Proteinkinasen TAK1 und IKK2 und lassen sich durch niedermolekulare Inhibitoren dieser Enzyme blockieren. Des Weiteren wurden durch einen gezielten RNAi-Screen sechzehn neue nukleäre Ko-Regulatoren des IL-1 Signalwegs identifiziert. Dabei zeigten nur die Histonacetyltransferase Ep300 und der Transkriptionsregulator Sin3a eine IL-1-abhängige Rekrutierung an die prototypischen IL-1 Zielgene *IL8* und *CXCL2*. Sin3a stellt eine bisher unbekannte Komponente im nukleären IL-1 Signalweg dar. Dieses Protein besitzt selbst kein bekanntes DNA-Bindemotiv oder enzymatische Aktivität und wurde bisher vor allem als Gerüstprotein von Ko-Repressor-Komplexen charakterisiert. Die hier erhobenen Locus-spezifischen ChIP-PCRs und genomweiten ChIP-seq Daten zeigten dagegen, dass Sin3a vor allem mit der Ser5-phosphorylierten Form von RNA Polymerase II an transkribierte Gene ko-rekrutiert wird. Die Chromatinassoziation von Sin3a an IL-1-abhängige NF- κ B Zielgene in humanen Epithelzellen und murinen embryonalen Fibroblasten ist ebenfalls durch den TAK1/IKK2/p65 Signalweg reguliert. Funktionelle Daten wiesen Sin3a eine gen- und zelltypspezifische Rolle als eine Art *shaping factor* zu, der die Transkription von Chemokinen modulieren kann. Die Befunde sind vereinbar mit der Formierung eines Stimulus-abhängigen und Sin3a-assoziierten RNA-Pol II Komplexes, dessen Funktion es sein könnte, eine überschießende Expression inflammatorischer mRNAs zu verhindern oder

eine De-Regulation des basalen Expressionsniveaus zu kontrollieren. Diese Mechanismen und die dabei beteiligten Faktoren bieten neue Ansatzpunkte, um die molekulare Regulation von Chemokinen oder weiteren IL-1 Zielgenen auf Chromatinebene besser zu verstehen. Da eine Dysregulation der Transkription von IL-1- und NF- κ B p65-abhängigen Genen zu schweren chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen führen kann, tragen diese Erkenntnisse nicht nur zu einem verfeinerten Verständnis der komplexen entzündlichen Genregulation im Zellkern bei, sondern helfen auch, neue Zielstrukturen für zukünftige Therapiemöglichkeiten zu definieren.

1.2 Summary

The cytokine interleukin (IL)-1 is an important mediator of the innate immune system and is capable of triggering the entire spectrum of clinical symptoms during local as well as systemic inflammation. At the cellular level, IL-1 reprograms inflammatory gene expression within the nucleus through a network of signaling cascades. However, compared to the cytoplasmic signaling pathways, the nuclear signal transduction is significantly less understood. Besides the transcription factor NF- κ B, further transcription factors, such as AP-1 proteins, and co-regulators are activated and recruited to IL-1-induced target genes, for example to the loci of chemokine genes. This points to cooperative modes by which these factors regulate gene expression. Hence, in the course of this work, the role of NF- κ B p65 at IL-1-induced promoters and regulatory enhancers was characterized in detail. Using a combination of knockdown approaches, ChIP-PCRs and ChIP-seq experiments, the function of a master regulator could be assigned to p65 that promotes locally but also genome-wide the H3K27 acetylation at already pre-marked enhancers. Thereby, these enhancer elements became further activated. p65 also controlled all subsequent IL-1-dependent binding events at promoters and enhancers. These functions of p65 require the catalytic activation of the apical cytoplasmic protein kinases TAK1 and IKK2 and can be blocked by small molecular inhibitors of their enzymatic activity. Furthermore, sixteen new nuclear co-regulators of the IL-1 signaling pathway were identified by a restricted RNAi screen. Of these, only the histone acetyltransferase Ep300 and the transcriptional regulator Sin3a showed an IL-1-dependent recruitment to the prototypical IL-1 target genes IL8 and CXCL2. Sin3a represents a previously unknown component of the nuclear IL-1 signaling pathway. This protein does not contain any known DNA-binding motifs, lacks any enzymatic activity and has been previously mainly characterized as a scaffold for co-repressor complexes. In contrast, the results obtained during this thesis by locus-specific ChIP-PCRs or by genome-wide ChIP-seq experiments revealed that Sin3a is co-recruited to transcribed genes in particular together with the Ser5-phosphorylated form of the RNA-polymerase II. The chromatin association of

Sin3a at IL-1-dependent NF- κ B target genes in human epithelial cells and murine embryonic fibroblasts is also regulated by the TAK1/IKK2/p65 pathway. Functional data indicated a gene- and cell-type-specific role for Sin3a as a kind of shaping factor to modulate the transcription of chemokines. These findings are compatible with the formation of a stimulus-dependent and Sin3a-associated RNA-Pol II complex whose function may be to prevent excessive expression of inflammatory mRNAs or to control the de-regulation of their basal expression levels. The mechanisms and the factors involved in this regulatory function provide new approaches leading to a better understanding of the molecular regulation of chemokines or other IL-1 target genes at the level of chromatin. As dysregulation of IL-1- and NF- κ B p65-dependent gene transcription can cause severe chronic inflammation and autoimmune diseases, the findings of this work contribute to an improved understanding of the complex gene regulation of nuclear inflammatory processes and may help to unravel new targets for future alternative treatment options.

2 Einleitung

2.1 Zytokine und die Entzündungsantwort

Zytokine sind kleine Proteine, welche die Antwort auf Infektionen, Immunantworten und Entzündungen regulieren. Einige Zytokine verstärken Entzündungen und sind damit pro-inflammatorisch wirksam, andere unterstützen die Wundheilung oder sind anti-inflammatorisch [1]. Während einer Infektion werden PAMP (*pathogen-associated pattern*) oder DAMP (*damage- or danger-associated molecular pattern*) Signale durch spezifische Rezeptoren erkannt. Die aktivierten Rezeptoren führen zur Synthese und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (Interleukinen [z.B. IL-1, IL-6, IL-33], Tumor Nekrose Faktor [TNF α] und Chemokinen [z.B. IL-8 & CXCL2]). Diese Zytokine koordinieren die Wirtsantwort, um die Infektion zu bekämpfen [2, 3]. Dabei stammen PAMP Signale von pathogenen Mikroorganismen, während DAMP Signale auf eine sterile Infektion z.B. durch endogene Mediatoren oder exogenen Stress zurückgehen [4, 5]. Während einer Entzündung können die freigesetzten Zytokine auch an die Rezeptoren auf der sezernierenden Zelle binden. Dieser selbst-verstärkende Kreislauf (*feed-forward loop*) amplifiziert die angeborene Immunantwort und führt z.B. zu einer raschen Eindämmung der Infektion. Anschließend muss diese starke Amplifikation wieder herunterreguliert werden, was über negative Regelkreisläufe geschieht (*negative feedback loops*). Hierzu gehört unter anderem die Synthese von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-1Ra, IL-10, TGF- β , IL-37). Fehlfunktionen beider Regelkreisläufe können zu schweren Erkrankungen führen, wie z.B. zu Rheumatoider Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn) oder Psoriasis [3, 6]. Ein Fokus der Entzündungsforschung besteht daher darin, Zytokinwirkungen therapeutisch zu modulieren. Zum Teil ist dies über neutralisierende Antikörper oder Rezeptorantagonisten schon recht erfolgreich möglich [1].

2.2 Die Interleukin (IL)-1 Familie

Interleukin (IL)-1 ist ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und der lokalen und systemischen Entzündungsantwort [7]. Alle Zellen des angeborenen Immunsystems und viele weitere Gewebe exprimieren Mitglieder der IL-1 Familie und/oder werden von ihnen beeinflusst [8]. Dies beinhaltet Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Basophile und Mastzellen [7, 9].

Die IL-1 Familie besteht aus sieben Liganden mit Agonist-Aktivität (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β und IL-36 γ), drei Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra, IL-36Ra und IL-38) und

einem anti-inflammatorischen Zytokin (IL-37) (Tab.1). Zu den IL-1 Rezeptoren zählen elf Moleküle (IL-1R1, IL-1R2, IL-1RAcP, ST2, IL-18R α , IL-1Rrp2, IL-36R, IL-18R β , TIR8, TIGIRR-2 und TIGIRR-1) (Tab.1). Die Rezeptoren zeichnen sich mit wenigen Ausnahmen durch eine extrazelluläre Kette mit drei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen aus. Der intrazelluläre Teil wird durch eine TIR-Domäne charakterisiert, die für die Signalweiterleitung über Myd88 benötigt wird. Alle Mitglieder der IL-1 (IL-1R) und *Toll-like* (TLR) Rezeptorfamilien besitzen eine TIR-Domäne, welche für IL-1 und LPS (Lipopolysaccharid)-Signalwege essentiell ist [6]. Es werden vier signalübertragende Rezeptor-Komplexe gebildet: IL-1 Rezeptor aus IL-1R1 und IL-1RAcP, IL-33 Rezeptor aus ST2 und IL-1RAcP, IL-18 Rezeptor aus IL-18R α und IL-18R β , sowie IL-36 Rezeptor aus IL-1Rrp2 und IL-1RAcP. Außerdem existieren zwei *decoy*-Rezeptoren, IL-1R2 und IL-18BP, welchen die zytoplasmatische Domäne fehlt, sodass sie eine Signalweiterleitung in die Zelle blockieren. TIR8 und IL-1RAcPb agieren dagegen als negative Regulatoren [8].

Zytokin	Rezeptor	Ko-Rezeptor	Aktivität
IL-1 α	IL-1R1, IL-1R2	IL-1RAcP	Alarmin, Entzündung, Th17 Zellantworten
IL-1 β	IL-1R1, IL-1R2	IL-1RAcP	Antimikrobielle Resistenz, Entzündung, Th17 Zellantworten
IL-1Ra (Anakinra)	IL-1R1		Inhibierung der Entzündung
IL-18	IL-18R α	IL-18R β	Entzündung, Th1 Zellantworten
IL-33	ST2	IL-1RAcP	Entzündung, Th2 Zellantworten
IL-36 α	IL-1Rrp2	IL-1RAcP	Entzündung der Haut und Lunge
IL-36 β	IL-1Rrp2	IL-1RAcP	Entzündung der Haut und Lunge
IL-36 γ	IL-1Rrp2	IL-1RAcP	Entzündung der Haut und Lunge
IL-36Ra	IL-1Rrp2		Inhibierung der Entzündung
IL-37	IL-18R α		Inhibierung der Entzündung
IL-38	IL-1Rrp2		Inhibierung der Entzündung
	TIR8		Inhibierung der Entzündung
	TIGIRR-1		Nicht geklärt

TIGIRR-2

Nicht geklärt

(IL-1R1)

IL-1RAcPb

Inhibierung der Entzündung

Tabelle 1: Nomenklatur und Funktionen der IL-1 Familie (modifiziert nach [8])

IL-1 α und IL-1 β werden von separaten Genen kodiert, binden aber an denselben Rezeptor (IL-1R1) und haben ähnliche biologische Fähigkeiten. Der IL-1 α Vorläufer wird konstitutiv in Keratinozyten und Epithelien des Gastrointestinaltrakts, der Leber, Lunge und Nieren, sowie in Endothelzellen und Astrozyten exprimiert. Er wird nicht sezerniert, sondern nur nach einem Zelltod durch Nekrose freigesetzt, wodurch eine eher lokale Wirkung vermittelt wird [1, 10]. Zusätzlich präsentieren aktivierte Monozyten und B-Lymphozyten eine membranständige IL-1 α Form [8, 11]. Im Gegensatz zum IL-1 β Vorläufer, ist der IL-1 α Vorläufer voll aktiv und fungiert als Alarmsignal (Alarmin), indem er sehr schnell eine Kaskade von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen initiiert, die zur sterilen Entzündung beitragen [10, 12]. Das über das Inflammasom freigesetzte IL-1 β ist dagegen an systemischen Entzündungsprozessen beteiligt, bei welchen es zur schnellen Sekretion und Aktivierung des Inflammasoms kommt [1, 10].

2.3 IL-1-induzierbare Signalwege

IL-1 vermittelt über als Netzwerke verschaltete Signaltransduktionswege die komplexe Regulation seiner Zielgene [13]. Nach der Bindung an den IL-1 Rezeptor folgen Signalkaskaden, die schließlich zur Aktivierung der NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 MAP Kinase Signalwege führen (Abb.1). Diese induzieren kooperativ die Expression von IL-1 Zielgenen wie *IL-6*, *IL-8*, *I κ B α* , *IL-1 α* und *IL-1 β* [13, 14].

Nach der Erkennung durch den IL-1 Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung in der ersten extrazellulären Domäne des Rezeptors, wodurch das IL-1 Rezeptor-assoziierte Akzessorische Protein (IL-1RAcP) rekrutiert wird [15]. Die TIR-Domänen des *Triple*-Komplexes vermitteln ein rasches Anlagern von MYD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) und IRAK4 (*interleukin-1 receptor-activated protein kinase 4*) [16]. Durch eine Autophosphorylierung von IRAK4 und anschließender Phosphorylierung von IRAK1 und 2 kommt es zur Rekrutierung und Oligomerisierung von TRAF6 (*tumor necrosis factor-associated factor*) [17]. TRAF6 dient dabei als E3 Ubiquitin-Ligase, die K63-verknüpfte, nicht-degradative Polyubiquitinketten unter anderem auf die MAP3 Kinase TAK1 (*TGF- β -activated protein kinase kinase kinase 7*) überträgt [18, 19]. Dabei vermittelt das Adaptermolekül

TAK1/TAB1-Komplex mit TRAF6 und IRAK, während die regulatorische Untereinheit TAB1 die Stimulus-abhängige Auto-Phosphorylierung von TAK1 aktiviert [20]. Das aktivierte TAK1 induziert als Komplex die nachfolgenden Signalwege: NF- κ B, JNK und p38 MAPK [13, 21] (Abb.1).

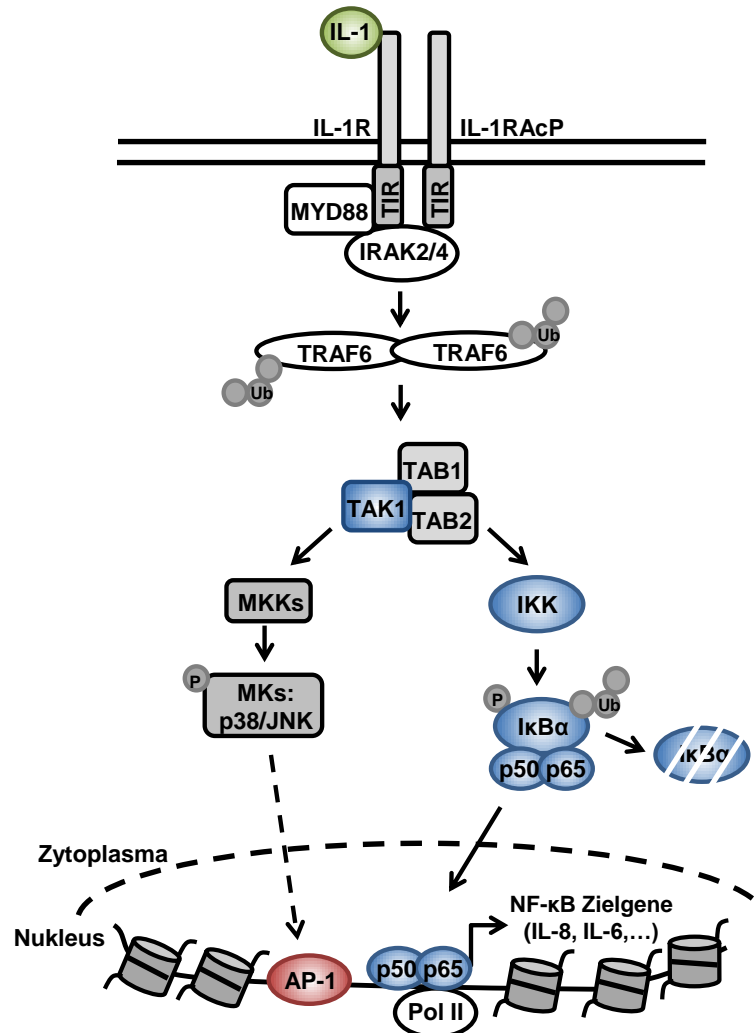


Abbildung 1: IL-1-induzierte Signalwege. IL-1 bindet an den IL-1 Rezeptor (IL-1R), welcher mit dem IL-1R Akzessorischen Protein (IL-1RAcP) an der Zelloberfläche assoziiert. Das Signal wird über die TIR-Domänen und MYD88 in die Zelle weitergeleitet. Dadurch wird der IL-1R-assozierte Kinasen (IRAKs) fördern die K63-verknüpfte Polyubiquitinierung von TRAF6, was zur Interaktion mit TAK1 im Komplex mit TAB1/TAB2 führt. TAK1 aktiviert den IKK-Komplex, der die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und schließlich den proteasomalen Abbau von IκBα bewirkt. Das freigesetzte NF-κB Dimer kann in den Nukleus translozieren und inflammatorische Genexpression induzieren. Zusätzlich führt die Aktivierung von TAK1/TAB1/TAB2 zur Phosphorylierung und Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), JNK und p38. Diese Kinasen phosphorylieren und aktivieren weitere Transkriptionsfaktoren und Ko-Faktoren, die kooperativ zur Induktion der inflammatorischen Genexpression beitragen. (Abbildung modifiziert nach [22])

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch IL-1 hängt von der Aktivierung von IKK2/β (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*) ab. IKK1/α

(*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*), IKK2/ β und NEMO/IKK γ (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma*) bilden zusammen den IKK-Komplex [23, 24]. Der aktivierte Komplex phosphoryliert I κ B α (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*), was dessen Polyubiquitinierung und proteasomalen Abbau bewirkt [25]. Durch den Abbau des inhibitorischen Proteins wird das NF- κ B Dimer aus p65 und p50 freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren. Dort bindet es an die DNA, indem es sein konserviertes κ B-Sequenzmotiv erkennt. Dieses Motiv ist in zahlreichen IL-1-responsiven Zielgenen zu finden [26]. Der C-Terminus von p65 beinhaltet die transaktivierende Domäne (TAD), welche die mRNA Synthese durch die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren z.B. p300/CBP (CREB-binding protein) und der RNA Polymerase II induziert [13, 27, 28].

TAK1 und MEKK3 aktivieren neben NF- κ B auch die MAPK Kinasen MKK3, 4, 6 und 7 [29, 30]. MKK4 und 7 aktivieren anschließend die MAP-Kinase JNK, die AP-1 Proteine aktiviert [31, 32]. MKK3, 4 und 6 induzieren dagegen den p38 MAPK Signalweg, der für die Stabilität von pro-inflammatorischen mRNAs benötigt wird [13, 33], nukleäres NF- κ B p65 über MSK1 an S276 phosphoryliert und dessen Zugänglichkeit für einige Promotoren durch die Phosphorylierung an H3S10 verbessert [34, 35]. AP-1 Proteine sind bZIP-Transkriptionsfaktoren, die eine basische DNA-Bindedomäne besitzen und durch ihr charakteristisches Leuzin-Zipper-Motiv Homo- oder Heterodimere aus Mitgliedern der Jun- (z.B. c-Jun, JunB und JunD), der Fos- (z.B. c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K und Nrl), sowie der ATF-Familie (z.B. ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1, JDP2) ausbilden können [36-39]. Sie binden an regulatorische Sequenzen der Promotoren und Enhancer ihrer Zielgene, wobei ihre Zusammensetzung und Funktion je nach Zelltyp und Stimulus variiert [40]. AP-1 Komplexe spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Differenzierung, Transformation und Apoptose/Überleben von Zellen, wobei sie sowohl pro-onkogene als auch Tumorsuppressor-Eigenschaften besitzen [39, 40]. Da viele Entzündungsgene Bindestellen für beide Transkriptionsfaktoren, NF- κ B und AP-1, besitzen, findet durch die simultane Aktivierung ein *Crosstalk* bei der Regulation von IL-1-abhängigen Zielgenen statt.

2.4 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B tritt als Homo- oder Heterodimer auf und setzt sich aus den fünf Untereinheiten p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 und p105/p50 zusammen [41]. Diese Dimere zeigen verschiedene biologische Funktionen, was auf ihrer DNA Bindungsaffinität bzw. Spezifität und ihrer Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und Ko-Faktoren

basiert [42]. Sie alle besitzen eine konservierte Rel-Homologiedomäne (RHD) nahe dem N-Terminus, die eine Dimerisierung, Inhibitor Bindung, nukleäre Translokation und DNA Bindung ermöglicht [43]. Je nach Zusammensetzung können transkriptionell aktive oder inaktive Komplexe entstehen [26, 44]. Dazu besitzen nur p65, RelB und c-Rel C-terminale transaktivierende Domänen (TADs) [45]. Die TADs interagieren mit Komponenten des Transkriptionsapparates z.B. TBP (TATA-bindendes Protein) [46], TFIIB (Transkriptionsfaktor IIB) [47] und p300/CBP [48, 49]. Der prototypische NF- κ B Komplex ist ein Heterodimer aus p65 und p50 [50] (Abb.2).

Es wird zwischen dem klassischen (kanonischen) und alternativen (nicht-kanonischen) NF- κ B Signalweg unterschieden. Die Hauptfunktionen des nicht-kanonischen Signalwegs sind die Entwicklung und Organisation von sekundären lymphoiden Organen und die B-Zell Reifung, wohingegen der kanonische Signalweg für die Aktivierung von angeborenen Immunantworten und das Überleben von Immunzellen essentiell ist [51]. Der nicht-kanonische Weg zeichnet sich vor allem durch die NF- κ B Komplexe RelB/p52 oder RelB/p50 aus und wird über die Kinase IKK α reguliert [52]. Die NF- κ B Proteine werden im Zytosol durch I κ B inhibitorische Proteine zurückgehalten, welche sich durch Ankyrin-Wiederholungen charakterisieren. I κ B α , als prototypisches Mitglied, bindet im Zytosol an den kanonischen p65/p50-Komplex und muss degradiert werden, damit der Komplex in den Zellkern translozieren kann [42] (Abb.2). Im nicht-kanonischen Signalweg fungiert dagegen p100, der Vorläufer von p52, als I κ B-ähnliches Molekül mit Ankyrin-Wiederholungen und inhibiert die Translokation [53]. Alle I κ B-Proteine sind selbst NF- κ B Zielgene und werden daher über einen negativen Regelkreislauf kontrolliert [54].

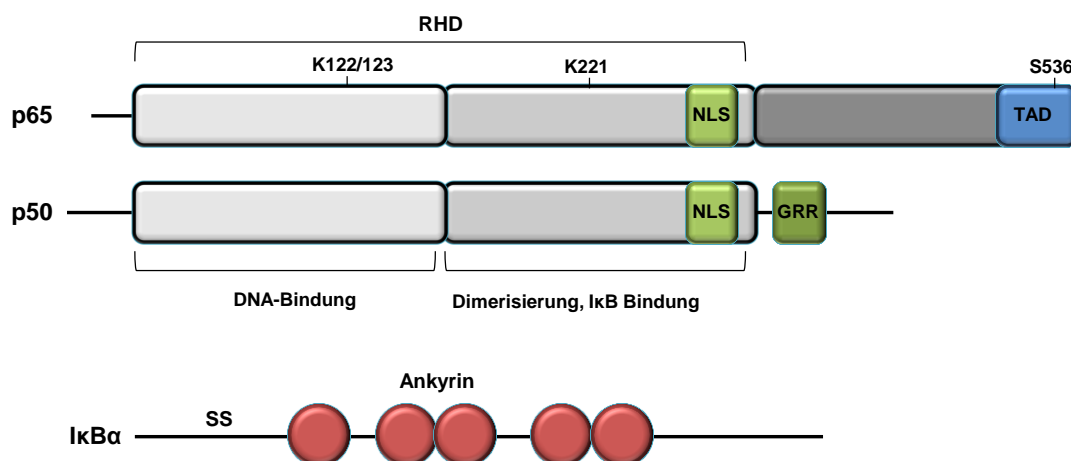


Abbildung 2: Aufbau von p65, p50 und I κ B α . p65 und p50 besitzen eine N-terminale Rel-Homologiedomäne (RHD), wobei der vordere Teil für die spezifische DNA Bindung an κ B-Motive benötigt wird und der hintere Teil für die Dimer-Bildung und die Bindung an Proteine mit Ankyrin-Wiederholungen z.B. I κ B α . An I κ B α gebunden ist das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) von p65 maskiert, wodurch eine Translokation in den Zellkern oder die Bindung an die DNA verhindert wird. Die Phosphorylierung von zwei Serin-Resten in I κ B α (SS) vermittelt die Polyubiquitinierung mit

anschließendem proteasomalen Abbau. p65 besitzt im Gegensatz zu p50 eine C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD). p65 kann an verschiedenen Lysinen (K) und Serinen (S) posttranslational modifiziert werden. Die Glycin-reiche Region (GRR) in p50 ist für die ko-translationalen Prozessierung von p105 zu p50 wichtig. (Abbildung modifiziert nach [50])

2.5 Chemokine als typische IL-1 Zielgene

Pro-inflammatorische Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die primär Leukozyten zu Infektionen und Wunden rekrutieren und von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden können [22]. Dazu induzieren sie die Expression von Integrinen, welche die konzentrationsabhängige Wanderung von Immunzellen begünstigen [22, 55]. Neben der Chemotaxis üben Chemokine weitere inflammatorische und homöostatische Funktionen aus z.B. die Differenzierung von T-Helferzellen, Wundheilung und Angiogenese [56-58]. Zur Zeit sind ca. 48 Chemokine und 23 Chemokin-Rezeptoren im humanen Genom bekannt [58, 59].

Chemokine sind eine Gruppe aus kleinen (8-12 kDa) Proteinen, die durch die Anwesenheit von drei bis vier konservierten Cystein-Resten charakterisiert werden. Sie können in vier Familien unterteilt werden, wobei die Einteilung auf der Position der N-terminalen Cystein-Reste basiert: CXC, CC, C und CX3C [22, 60]. Die Signaltransduktion von Chemokinen wird durch eine Vielzahl an 7-Transmembran-Domänen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt [61]. Die G-Proteine assoziieren dabei mit dem C-Terminus des Rezeptors. Ein Stimulus induziert Konformationsänderungen, welche zur Signalweiterleitung führen [62].

Die meisten Chemokine sind durch Genduplikationen entstanden, was ihre genomische Organisation geprägt hat [63, 64]. Viele Chemokine und Chemokin-Rezeptoren treten in Clustern auf definierten Chromosomenabschnitten auf. Zwei in dieser Arbeit untersuchte Cluster kodieren für essentielle inflammatorische Chemokine: Der CXC-Cluster auf Chromosom 4 (4q12-21) und der CC-Cluster auf Chromosom 17 (17q11.2). Beide Cluster zeichnen sich durch ihre spezifische Funktion Neutrophile (CXC-Cluster) bzw. mononukleäre Zellen (CC-Cluster) zu rekrutieren aus [63]. Die CXC-Chemokine unterteilen sich in zwei Subgruppen, basierend auf der Präsenz eines Glu-Leu-Arg (ELR)-Motivs vor dem ersten Cystein-Rest. Chemokine mit diesem Motiv (CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8/IL-8) sind an der Angiogenese beteiligt und binden an die CXCR1 und 2 Rezeptoren [58, 65, 66].

IL-8 (CXCL8) ist als kritischer inflammatorischer Mediator gut untersucht. Es rekrutiert als Monomer und Dimer hauptsächlich Neutrophile, ist aber auch an der Migration von Monozyten, Lymphozyten, Basophilen und Eosinophilen zum Entzündungsherd beteiligt [67, 68]. In gesundem Gewebe ist IL-8 kaum detektierbar, als Antwort auf ein inflammatorisches Zytokin, bakterielle oder virale Produkte und zellulären Stress wird es jedoch umgehend induziert [14]. Nach der Bindung von sekretiertem IL-8 an CXCR1 oder 2 führen

Signalkaskaden zur Chemotaxis der Zielzelle oder Degranulation [69]. Eine unkontrollierte Expression von Chemokinen ist mit verschiedenen Auto-Immunerkrankungen, chronischen Entzündungen und der Bildung von Metastasen verbunden [58]. Humane Krebszellen exprimieren onkogene Ras-Proteine, welche das Tumorwachstum, die Invasionsfähigkeit und die Induktion von neuen Blutgefäßen beeinflussen. Ras induziert die Sekretion von IL-8, was eine lokale Entzündung hervorruft, welche für die Neubildung von Blutgefäßen und das Tumorwachstum kritisch ist [70, 71].

2.6 Regulation von NF- κ B Zielgenen auf der Ebene des Chromatins

Die Expression von NF- κ B Zielgenen wird in verschiedenen Zelltypen durch unterschiedliche Stimuli induziert oder gehemmt. Dabei agieren die NF- κ B Untereinheiten nicht allein, sondern sind Teil einer großen und komplexen Regulationsmaschinerie auf mehreren Ebenen, die eine enorme Spezifität der Zellantwort ermöglicht [41, 72].

Die Regulation beginnt bereits bei der Differenzierung von Zellen, indem Enhancer als regulatorische Elemente durch die Besetzung von Schlüsselregulatoren und Transkriptionsfaktoren definiert werden [73, 74]. Enhancer werden als Sequenzen charakterisiert, welche die Transkription eines Zielpromotors verstärken können. Dabei kann eine erhebliche Distanz von einigen Kilobasen bis zu einigen Hundert oder Tausend Kilobasen zwischen Enhancer und Promotor liegen, wobei die Orientierung keine Rolle spielt [75]. Weiterhin werden Enhancer durch eine Depletion an stabilen Nukleosomen definiert, was eine Hypersensibilität der DNA auf Nukleasebehandlungen verursacht. Außerdem weisen sie spezifische posttranslationale Modifikationen der Histone auf wie z.B. H3K4me1 und H3K27ac [76, 77]. Obwohl die Funktionsmechanismen von Enhancern bisher unzulänglich beschrieben wurden, ermöglichen sie vermutlich eine Rekrutierung von Ko-Aktivatoren und der Transkriptionsmaschinerie zum Zielpromotor. Dies kann durch die Ausbildung von DNA-Schleifen vermittelt werden, welche beide Loci in eine enge räumliche Nähe bringen [77, 78]. Möglicherweise erlaubt zunächst eine Sequenz von unmethylierten CpG Dinukleotiden in pluripotenten Zellen die Bindung von Schlüsselregulatoren [79, 80]. Dies ist mit Veränderungen in der Chromatinstruktur verbunden. Beispielsweise weisen solche Regionen in Makrophagen eine niedrigere Nukleosomendichte auf, nachdem der Schlüsselregulator PU.1 gebunden hat [73, 74]. Die Rekrutierung fördert die Monomethylierung an H3K4 (H3K4me1), welche mit aktiven Enhancern assoziiert wird [76]. Diese markierten Enhancer-Regionen können in differenzierten Zellen Stimulus-spezifisch reguliert werden. Dabei wird die maximale Zugänglichkeit dieser Regionen durch Chromatin-Remodellierung erst durch den Stimulus induziert [72]. Zu den Chromatin remodellierenden

Mechanismen zählen zwei Typen von Enzymen: Chromatin-Remodellierungs-Komplexe (z.B. der SWI/SNF-Komplex), welche die Position oder Dichte von Nukleosomen verändern, und Histon-modifizierende Enzyme (z.B. Histon-Acetyltransferasen, Histon-Deacetylasen, Kinasen und Methyltransferasen), welche die N-Termini der Histone modifizieren [50]. Histonmodifikationen können die Zugänglichkeit von Promotoren und Enhancern für Transkriptionsfaktoren, Ko-Faktoren und die Transkriptions-Maschinerie fördern oder als Barrieren inhibieren und stellen daher einen Regulationsmechanismus der Genexpression dar. Solche Barrieren, z.B. die Methylierung an H3K9 und H3K27 oder stabile Nukleosomen an Promotoren, können durch einen externen Stimulus entfernt werden [81-84]. Aktivierende Histonmodifikationen an Promotoren oder Enhancern sind z.B. die Acetylierungen an H3K9 und H3K27 oder die Phosphorylierung an H3S10 [34, 85, 86].

Ein weiterer Regulationsmechanismus von NF- κ B Zielgenen ist die Verwendung verschiedener Dimer-Konstellationen in Kombination mit unterschiedlichen κ B Sequenzen. Die 9-11 bp langen Sequenzelemente setzen sich aus der Konsensussequenz 5'-GGGRNWYYCC-3' (R Purin, N unbestimmte Base, W Adenin oder Thymin, Y Pyrimidin) zusammen [87, 88]. Dabei zeigen die meisten κ B Sequenzen keine oder nur wenig Selektivität für bestimmte NF- κ B Dimere. Es bestehen jedoch kleine Unterschiede in der relativen Affinität von NF- κ B Dimeren für eine κ B Sequenz [89, 90]. Die geringe Selektivität der κ B Sequenzen bedeutet jedoch nicht, dass alternative NF- κ B Dimere funktional äquivalent sind [88]. Jedes Dimer hat spezifische Effekte auf die transkriptionelle Aktivität und dient der Feinjustierung der Genregulation [91]. Es ist aber bisher weitgehend unverstanden, wie einige Tausend κ B Sequenzen interagieren, um die Aktivität von 200-300 NF- κ B Zielgenen zu regulieren [88]. Dabei ist auch die Kinetik der Genaktivierung reguliert und kann sich in verschiedenen Zelltypen unterscheiden. Zum Beispiel wird NF- κ B erst 2 h nach einer LPS-Stimulation in Makrophagen an den *IL6* Promotor rekrutiert, während dies in Fibroblasten sehr schnell geschieht [88].

Neben den Histonmodifikationen tragen auch posttranslationale Modifikationen der NF- κ B Dimere zur Regulation der Zielgene bei. Diese können die Interaktion mit Ko-Regulatoren beeinflussen, welche die Chromatinstruktur verändern [72]. Hier sind vor allem Phosphorylierung, Monomethylierung, Ubiquitinierung und Acetylierungen von Bedeutung [50, 92]. Die p65 Untereinheit wird in ihrer RHD und TAD Domäne durch zahlreiche Kinasen im Zytoplasma und im Zellkern durch verschiedene Stimuli an unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen phosphoryliert [50, 93] z.B. an Serin 536 durch IKKs [94-96], RSK1 [97], TBK1 [98] und CDK6 [99]. CDK6 interagiert dabei nicht nur mit p65, sondern bindet auch an induzierte Zielgene, wo es für die Beladung mit p65 benötigt wird [100]. Die Phosphorylierung von p65 kann in einer gesteigerten oder reduzierten Transkription der

Zielgene resultieren, indem es die Rekrutierung von weiteren Transkriptionsfaktoren und Ko-Faktoren ermöglicht z.B. führt die Phosphorylierung an Serin 276 zur Interaktion von p65 mit CBP/p300 [50, 93, 101]. Reversible Acetylierungen an Lysinen von p65 im Zellkern regulieren die Stärke und Dauer der transkriptionellen Aktivität, indem sie die Konformation des Proteinkomplexes oder Bindungsaffinitäten verändern und eine Bindestelle für Transkriptionsfaktoren darstellen [93]. Die acetylierten Lysin-Reste können von Bromodomänen erkannt werden, welche in fast allen bekannten Histon-Acetyltransferasen (HATs) vorkommen [102]. Zum Beispiel wird acetyliertes Lysin 310 in p65 durch zwei Bromodomänen in Brd4 erkannt, welches CDK9 rekrutiert und aktiviert, um die RNA Polymerase II für die Transkription von NF- κ B Zielgenen zu phosphorylieren [103]. Die Ko-Regulatoren CBP/p300 und p300/CBP-assoziiierter Faktor (PCAF) fungieren an vielen Lysin-Resten als Acetyltransferasen, während Histondeacetylasen z.B. HDAC3 und SIRT1 Acetyl-Reste wieder entfernen [50, 92, 104-106]. HDAC3 kann dabei auch aktivierend auf die Transkription von NF- κ B Zielgenen wirken [92]. Die Modifikationen können an verschiedenen Lysinen unterschiedliche Funktionen besitzen. Zum Beispiel verstärkt die Acetylierung an Lysin 221 die DNA Bindung von p65, während die Acetylierung an Lysin 122 und 123 diese Bindung hemmt [105]. Durch Assoziation mit neu synthetisiertem I κ B α , welches zwischen Kern und Zytoplasma translozieren kann, wird dann der nukleäre Export ermöglicht [104, 105, 107]. Neben der Phosphorylierung und Acetylierung sind auch reversible Methylierungen und Ubiquitinierungen von p65 bekannt, welche zur Regulation der NF- κ B Aktivität beitragen [93]. Die Polyubiquitinierung wird durch E3 Ubiquitin-Ligasen vermittelt z.B. SOCS1/COMMD1 und PDLIM2 [108-110]. Ubiquitinierte NF- κ B Untereinheiten werden im Zellkern und an der DNA proteasomal abgebaut, sodass die Aktivität von NF- κ B terminiert wird [111, 112] (Abb.3).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die komplexen Mechanismen der Genregulation von NF- κ B Zielgenen die synergistische Interaktion von variablen, modifizierbaren Dimer-Komplexen mit anderen Transkriptionsfaktoren und Ko-Regulatoren, die Remodellierung von Chromatinstrukturen, regulatorische Elemente z.B. Enhancer und den nukleären *Turnover* der beteiligten Proteine, sowie viele weitere Faktoren beinhalten [113]. An der Regulation dieser Mechanismen sind zahlreiche posttranslationale Modifikationen von NF- κ B beteiligt, wobei deren physiologische Bedeutung immer noch unklar bleibt. Viele Modifikations-abhängige Interaktionspartner sind unbekannt und die dynamische Regulation auf multiplen Ebenen ist damit nur unvollständig verstanden [114].

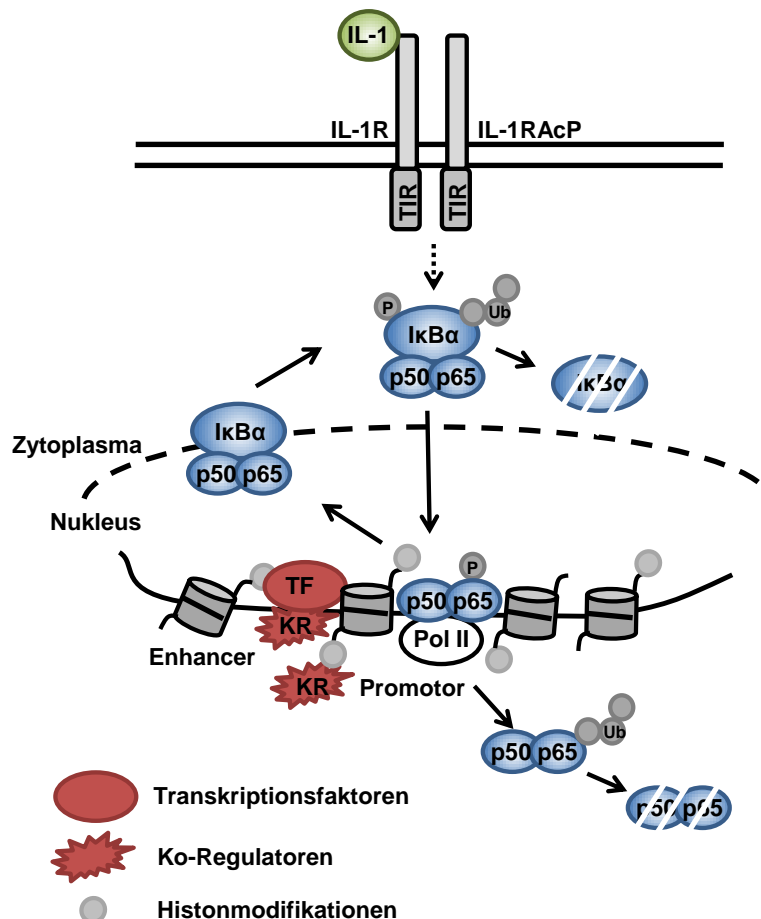


Abbildung 3: Wichtige Schritte der Regulation von NF-κB. Nach der Aktivierung des proximalen NF-κB Signalweges kommt es zum proteasomalen Abbau von IκBα im Zytoplasma und NF-κB transloziert in den Nukleus, wo es an seine κB Sequenzen u.a. an Promotoren und Enhancern bindet. Dort agiert es synergistisch mit weiteren Transkriptionsfaktoren (TF) und Ko-Regulatoren (KR), um die Gentranskription zu regulieren. Die Aktivität wird außerdem über Histonmodifikationen und Chromatin-Remodellierungen gesteuert. Mehrere Wege führen zur Termination der Transaktivierung, welche die IκB-vermittelte Rückführung von NF-κB ins Zytoplasma und die Ubiquitin-vermittelte nukleäre Degradation beinhalten. (Abbildung modifiziert nach [113])

2.7 Der Transkriptionsregulator Sin3a

Sin3 (*SWI-independent*) wurde zuerst 1987 über einen genetischen Screen in Hefezellen als negativer Regulator der HO-Endonuklease identifiziert [115, 116]. Nachfolgende Studien charakterisierten das Protein primär als negativen transkriptionellen Regulator, obwohl auch positive Regulation nachgewiesen wurde [117-122]. Sin3 interagiert mit DNA-bindenden Faktoren und dient somit als Gerüstprotein (*scaffold*), das Histondeacetylasen (HDACs) und andere Chromatin-modifizierende Enzyme an die Zielgene rekrutieren kann [121].

Es existieren mehrere paraloge Proteinvarianten und alternative Spleiß-Formen von Sin3 in verschiedenen Organismen, wodurch komplexe und divergente Funktionen von Sin3 ermöglicht werden [123]. In Säugern gibt es zwei paraloge Proteinformen, die von zwei

separaten Genen kodiert werden und vermutlich durch Genduplikation entstanden: Sin3a und Sin3b [124]. Diese zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit und überlappende Expressionsmuster. Sin3b hat jedoch ein verkürztes N-terminales Ende [125]. Die beiden Isoformen besitzen sowohl ähnliche, als auch nicht-überlappende Funktionen [123, 126, 127]. Der Verlust einer Isoform kann durch die jeweils andere meist nicht kompensiert werden [118, 126, 128]. Sie regulieren gleiche, aber auch unterschiedliche Zielgene und binden an dieselben oder unterschiedliche Transkriptionsfaktoren bzw. Ko-Faktoren [120]. Besonders in der embryonalen Entwicklung besitzen die Isoformen jedoch nicht-redundante Funktionen [117, 126, 129].

Das *SIN3* Gen wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* als 5.8 kb DNA-Fragment kloniert. Das Proteinprodukt beinhaltet 1536 Aminosäuren (~175 kDa) [130].

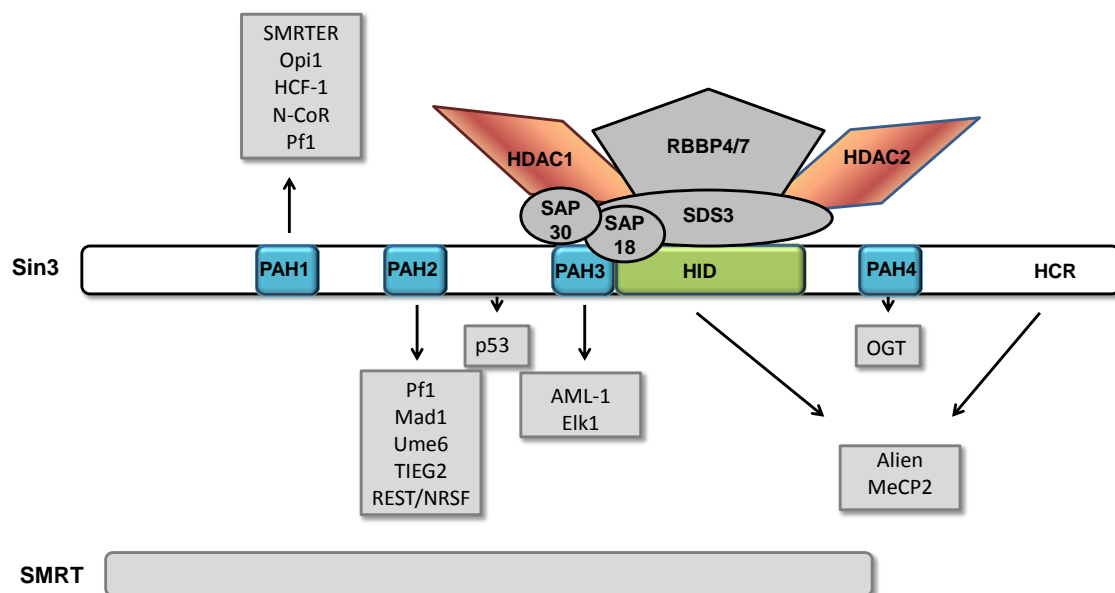


Abbildung 4: Aufbau und Interaktionspartner von Sin3. Dargestellt ist der Aufbau von Sin3 mit seinen 4 PAH (*paired amphipathic helices*)-Domänen, der Histondeacetylase (HDAC)-interagierenden Domäne (HID) und der hoch-konservierten Region (HCR) am C-Terminus. Außerdem sind bekannte Interaktionspartner und deren Bindungsstellen im Sin3 Protein gezeigt. Zum Kernkomplex gehören HDAC1, HDAC2, Sin3-assoziierte Proteine SAP30, SAP18, SDS3/SAP45 und Retinoblastoma Bindeproteine Rbbp4 und 7. Assoziierte HDACs können Histon H3 und H4 deacetylieren und bilden die katalytische Untereinheit des Sin3/HDAC-Korepressor Komplexes. SMRT kann als Adapterprotein für Sin3a dienen. (Abbildung modifiziert nach [118, 121])

Mit Hilfe seiner sechs konservierten Domänen kann Sin3 mit einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren und Ko-Faktoren interagieren (Abb.4). Zu diesen Domänen gehören vier PAH-Domänen (*paired amphipathic helices*), eine HDAC-interagierende Domäne (HID) und eine hoch-konservierte Region (HCR) (Abb.4). Jedes PHA-Motiv besteht aus einer hydrophilen und einer hydrophoben α -Helix, die durch 20 Aminosäuren voneinander getrennt

werden. Dabei dienen PAH1 und 2 vor allem der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, während PAH3, HID und PAH4 eine Plattform für die Bindung der weiteren Komplexuntereinheiten bilden [118]. Die PAH-Domänen von Sin3 zeigen untereinander geringe Sequenzähnlichkeiten, weisen aber große Ähnlichkeiten zu Helix-Loop-Helix Proteinen der Myc (Mad-Max1) Familie von Transkriptionsfaktoren auf und interagieren auch mit diesen [124, 131]. Die Struktur von Sin3 besitzt keine bekannten DNA-Bindemotive, Kinasedomänen, Membran-ständige Bereiche oder ATP-Bindestellen. Seine Aktivität als globaler transkriptioneller Regulator übt Sin3 allein durch die Interaktion mit katalytisch-aktiven Proteinen aus [121]. Die meisten beschriebenen Interaktionen finden zwischen PAH2 von Sin3a und Proteinen statt, die eine konservierte amphipathische α -Helix Domäne (SID = Sin3-interagierende Domäne) besitzen wie z.B. Mitglieder der Mad Familie, Sp-1 Familie und Ume6 [132-134]. Darüber hinaus zeigen einige Transkriptionsfaktoren auch Interaktionen mit PAH1 und Regionen außerhalb der PAH-Domänen. Die Interaktion kann aber auch indirekt über ein Adapterprotein erfolgen [121]. N-CoR und SMRT Ko-Repressoren verbinden den Sin3/HDAC-Komplex zum Beispiel mit nukleären Rezeptoren [135].

Der Sin3/HDAC Ko-Repressorkomplex ist ein Multiproteinkomplex aus mehreren Untereinheiten: HDAC1, HDAC2, RBBP4/7, SDS3, SAP30, SAP18, MeCP2 und RBP1 [136-138]. Es wurden weitere assoziierte Proteine identifiziert (SAP180, BRMS1, SAP130, SAP25 und ING1/2), welche die Interaktionen unterstützen und stabilisieren [137, 139, 140]. Sin3 besitzt selbst keine DNA-Bindeaktivität und kann daher nur als Plattform dienen, um Chromatin-modifizierende Enzyme wie Histondeacetylasen (HDAC1 und 2), N-Acetylglucosamin-Transferasen (OGT), Histon-Lysin-Methylasen (ESET) und -Demethylasen (RBP2), Transkriptionsfaktoren (p53, Rb, E2F, SMAR1 und REST/NRSF) und weitere Faktoren (z.B. Insulator CTCF) zusammenzubringen, welche dann die Chromatinstruktur reorganisieren [118, 121, 136, 141-143]. Die Zusammensetzung des Komplexes variiert dabei zelltyp- und funktionsspezifisch [138].

Die klassische Genregulation vermittelt der Sin3/HDAC Komplex über die Deacetylierung von Histon H3 und H4. In Kombination mit Methylierungen und Demethylierungen führt dies zur Sin3-vermittelten Genrepression [144]. Die Acetylierung der Kernhistone durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) entspannt die Nukleosomen, sodass die DNA zugänglicher für Transkriptionsfaktoren und Ko-Aktivatoren wird. Die Acetylierung von Lysinen der Histonenden verringert dabei die positive Ladung und führt somit zur Abstoßung von der negativ geladenen DNA. Durch die Interaktion zwischen Ko-Repressoren und Histondeacetylasen (HDACs) wird die kompakte Nukleosomenstruktur durch Deacetylierung wieder hergestellt und stabilisiert [118]. Viele Studien zeigen, dass die Sin3-vermittelte

Genrepression von der Hefe bis zum Menschen primär auf der Interaktion mit HDACs basiert [118, 136, 138, 145, 146].

Neben seiner Aktivität als Organisator transkriptioneller Repression, zeigt Sin3 auch Aktivatorfunktionen in Hefen und Säugern, welche zum Beispiel durch Hitze oder osmotischen Stress ausgelöst werden können [147, 148]. Bernstein *et al.* konnten in Expressionsanalysen von *sin3Δ* und *rpd3Δ* Hefezellen zeigen, dass 198 Gene herunter- und 107 Gene hoch-reguliert wurden, wobei die meisten Veränderungen von der HDAC-Aktivität des Komplexes abhängig waren [149]. In *Drosophila* zählten Pile *et al.* mittels RNAi 35 reprimierte und 364 hoch-regulierte Gene [150]. Die Mechanismen hinter der Genaktivierung sind im Gegensatz zur Genrepression jedoch weitgehend unbekannt. Ein möglicher Mechanismus wäre die Rekrutierung an Promotoren, was die RNA Polymerase II Anlagerung ermöglicht und/oder eine Deacetylierung von Nukleosomen strangabwärts vom Promotor, um eine effiziente Elongation zu unterstützen [147].

Obwohl zahlreiche Sin3-regulierte Genpromotoren identifiziert wurden, bleibt die Regulation von Sin3-Komplexen weitgehend unverstanden [120]. N- und C-Termini sind ubiquitiniert [151] und es wurde kürzlich eine post-transkriptionelle Regulation durch die Bindung einer microRNA (miR-138) im 3'UTR Bereich nachgewiesen [152]. Außerdem spielen Phosphorylierungen eine wichtige Rolle bei der Auflösung von Sin3/Transkriptionsfaktor-Interaktionen. Ellenrieder *et al.* konnten zeigen, dass die Mad1-*like* SID-Domäne des SP1-*like* Repressors TIEG2 durch den EGF-Ras-MEK1-ERK2 Signalweg über die Phosphorylierung von vier Serin/Threonin Resten nahe der SID-Domäne inhibiert wurde. Dies löste die Interaktion zwischen der SID-Domäne und Sin3a auf und inhibierte die Repressor-Aktivität von TIEG2 [153]. Sin3 kann außerdem den Abbau von Interaktionspartnern durch ihre Bindung beeinflussen z.B. von p53 [154].

Im letzten Jahrzehnt wurden diverse Rollen des Sin3 Komplexes identifiziert. Diese beinhalten die normale Entwicklung, das Wachstum und die Differenzierung von Zellen, aber auch die Transformation in Krebszellen [120]. Sin3 kann die Stabilität von Proteinen beeinflussen [150, 154-156], ist ein Schlüsselregulator in der Embryonalentwicklung vieler Organismen [121, 126, 157], hat Einfluss auf die Spermatogenese und Fertilität von Säugern [158], ist an der Entwicklung von Immunzellen beteiligt [129], spielt eine große Rolle bei der Muskelentwicklung [128] und Seneszenz von Zellen [159], ist wichtig für die Proliferation und Vitalität von differenzierten und embryonalen Zellen [117, 128, 129, 160], ist für die Kontrolle des Zellzyklus notwendig [126, 127] und am Energiemetabolismus beteiligt [161, 162]. Darüber hinaus wird Sin3a für die Segregation von Chromosomen, die rDNA-Stillegung und die DNA-Reparatur benötigt [120].

Die Rolle von Sin3 in Krebszellen ist sowohl onkogen, als auch suppressiv. Sin3a ist essentiell für das Überleben von transformierten Zellen [117] und eine verringerte Expression von Sin3a führt zu verstärkter Apoptose in Tumorzellen [163]. Mitglieder der Myc Familie von Onkogenen werden direkt oder indirekt in vielen humanen Tumoren aktiviert. Sie sind für die Transkription von Genen, welche die Zellproliferation, Transformation und Apoptose unterstützen, verantwortlich [121]. Das Wissen über die Rolle von Sin3 für die Tumorentstehung ist jedoch noch unvollständig.

Sin3 spielt eine große Rolle in der Embryonalentwicklung vieler Organismen. Ein Sin3a *knockout* in Mäusen ist früh-embryonal letal. Die Sin3a Deletion in somatischen Zellen z.B. embryonalen Maus Fibroblasten (MEFs) beeinträchtigt das Zellwachstum, die Apoptose und den G2/M Arrest [117, 129, 160, 164]. Dieser Zellzyklus-Arrest kann auch in *Drosophila* nach einer Sin3-Deletion beobachtet werden [150, 164]. Hier sterben Sin3 Null-Mutanten während der Larvenentwicklung. Für die Vitalität von *S. cerevisiae* ist Sin3 dagegen nicht essentiell [123].

2.8 Ziele der Arbeit

Der zytoplasmatische Signalweg der IL-1-induzierten Expression von Chemokinen ist relativ detailliert untersucht, während die nukleäre Regulation auf Ebene des Chromatins noch weitgehend unverstanden bleibt [50]. Auch hier existiert ein komplexes Netzwerk aus kooperativen und konkurrierenden Transkriptionsfaktoren, Ko-Regulatoren und Histonmodifikationen. Zur Untersuchung der molekularen Regulation dieser entzündlichen Gene in der Arbeitsgruppe Kracht wurde ein Cluster von CXC-Chemokingenen auf Chromosom 4 näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1-induziertes NF- κ B p65 an alle aktive Promotoren und an zwei regulatorische Enhancer-Strukturen in diesem Cluster bindet. Die *IL8*- bzw. *CXCL2*-flankierenden Enhancer zeichnen sich neben einer p65 Bindung auch durch eine IL-1-induzierte H3K27 Acetylierung und Rekrutierung von weiteren Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 Proteinen aus (Abb.5). Diese Befunde warfen die Frage nach der Hierarchie der untersuchten Bindungsereignisse und der Rolle von NF- κ B p65 für die Aktivierung der Enhancer auf. Um diese Fragen zu beantworten, sollten in der folgenden Arbeit „*loss-of-function*“ Zellsysteme etabliert und pharmakologische Inhibitoren verwendet werden, um Schlüsselregulatoren des Signalwegs auszuschalten und die Effekte am Chromatin mit Hilfe von Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) auszulesen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, neue nukleäre Ko-Regulatoren wie z.B. Histon-modifizierende Enzyme und Chromatin-remodellierende Komplexe zu identifizieren, die an der Regulation dieser IL-1-abhängigen Promotoren und Enhancer beteiligt sind. Dazu sollte ein RNAi-

3 Material

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Brand, Eppendorf, Greiner, Life Technologies, Neolab, Nunc, Omnilab, Roth oder Sarstedt bezogen.

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystem
AT 250 Waage	Mettler
BioruptorTMNextGen	Diagenode
Brutschrank CO ₂ Autozero	Heraeus
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese Power Supply EPS 600, 601 und 3500	Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf
Filmentwicklermaschine Curix 60	AGFA
Fluoreszenzmikroskop DMIRE2	Leica
Gel iX Imager UV-Transilluminator	INTAS
Kühl- und Gefrierschränke	Heraeus, Bosch
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Mikroskop DM IL	Leica
Multipette	Eppendorf
Mupid-EXu submarine electrophoresis system	Advance
Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab
OptimaTM TLX Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Pipetboy	Integra
Qubit Fluorometer	Invitrogen
Schüttler Unimax 2010	Heidolph
<i>semi-dry</i> -Blotter	Peqlab Biotechnologie
Sonifier 250	Branson
Sorvall RC5S Plus	Thermo Scientific
Spectramax Plus Microplate Spectrophotometer	Molecular Devices
Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472	Thermo Scientific
Thermocycler T Professional	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf

TJ-25 Zentrifuge	Beckman Coulter
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	GFL

3.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma verwendet.

3.3 Puffer und Lösungen

3.3.1 Puffer für Proteinlyse, Ko-Immunopräzipitation und Histon-Extraktion

Puffer	Zusammensetzung
Bohmann/Weiss-Lysepuffer [165]	50 mM HEPES pH 7,4 50 mM NaCl 1% (v/v) Tween 20 2,5 mM EGTA 1 mM EDTA 1 mM NaF 10 mM β -Glycerophosphat 0,1 mM Na_3VO_4 1 mM PMSF 1x Proteaseinhibitormix 1 mM DTT
Bohmann/Weiss-Waschpuffer [165]	50 mM HEPES pH 7,4 450 mM NaCl 1% (v/v) Tween 20 2,5 mM EGTA 1 mM EDTA 1 mM NaF 10 mM β -Glycerophosphat 0,1 mM Na_3VO_4

	1 mM PMSF
	1x Proteaseinhibitormix
	1 mM DTT
Speziallysepuffer	10 mM Tris
	30 mM Natriumpyrophosphat
	50 mM NaCl
	1% Triton X-100
	2 mM Na ₃ VO ₃
	50 mM NaF
	20 mM β-Glycerophosphat
	1 mg/ml Pepstatin
	5 mg/ml Leupeptin
	200 mM PMSF
	1 mM Microcystin
	Mit HCl auf pH 7,05 einstellen
Puffer I für fraktionierte Lyse	20 mM HEPES (pH 8,0)
	10 mM KCl
	1 mM MgCl ₂
	0,1% (v/v) Triton X-100
	20% (w/v) Glycerol
	50 mM NaF
	1 μM Microcystin
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1x Proteaseinhibitormix
Puffer II für fraktionierte Lyse	20 mM HEPES (pH 8,0)
	2 mM EDTA
	400 mM NaCl
	0,1% (v/v) Triton X-100
	20% (w/v) Glycerol
	50 mM NaF
	1 μM Microcystin
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1x Proteaseinhibitormix

Puffer III für fraktionierte Lyse	20 mM Tris (pH 7,5) 2 mM EDTA 150 mM NaCl 1% (w/v) SDS 1% (v/v) NP-40 50 mM NaF 1 µM Microcystin 1 mM Na ₃ VO ₄ 1x Proteaseinhibitormix
Triton-Extraktionspuffer für Histon-Extraktion	PBS 0,5% Triton X-100 (v/v) 2 mM PMSF 0,02% (w/v) NaN ₃ 50 mM NaF 1 µM Microcystin 1 mM Na ₃ VO ₄ 1x Proteaseinhibitormix

3.3.2 Puffer für Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Puffer	Zusammensetzung
PBS/1mM PMSF	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 1 mM PMSF vor Gebrauch zugeben
Lysepuffer	1% SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris/HCl pH 8,1 1 mM PMSF und 1,5x Roche vor Gebrauch zugeben
Dilutionspuffer	0,01% SDS 1,1% Triton X-100 1,2 mM EDTA

	167 mM NaCl 16,7 mM Tris/HCl pH 8,1
Niedrigsalzpuffer	0,1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris/HCl pH 8,1 150 mM NaCl
Hochsalzpuffer	0,1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris/HCl pH 8,1 500 mM NaCl
LiCl-Puffer	0,25 M LiCl 1% NP40 1% Deoxycholat 1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl pH 8,1
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA

3.3.3 Puffer für SDS-PAGE, Westernblot und Agarose-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	1 M Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen
Sammelgelpuffer	1 M Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen
10x Laemmli-Laufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% (w/v) SDS

1x Blotpuffer (<i>semi-dry</i>)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Ponceau-Rot Färbelösung	0,1% (w/v) Ponceau S 5% (v/v) Essigsäure
TBS (10x)	100 mM Tris 1,5 M NaCl mit HCl auf pH 7,4 einstellen
TBST (1x)	TBS mit 0,05% (v/v) Tween 20
TAE	40 mM Tris 0,11% (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA

3.3.4 Puffer für CaPO₄-Transfektion

Puffer	Zusammensetzung
HEBS (2x)	280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ mit NaOH auf pH 7,12 einstellen und sterilfiltrieren
HeLa Schockmedium	DMEM-Vollmedium 10% (v/v) Glycerol

3.3.5 Medien für Zellkultur und Bakterienkulturen

Medium	Zusammensetzung
DMEM-Vollmedium (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)	10% (v/v) FKS 20 µg/ml Streptomycin 20 U/ml Penicillin 2 mmol/l L-Glutamin

Einfriermedium	DMEM-Vollmedium 10% FKS (v/v) 10% DMSO (v/v)
LB-Medium	10 g BactoTrypton 10 g NaCl 5 g Hefeextrakt add. 1l ddH ₂ O autoklavieren
LB-Platten	18,5 g Standard I-Nähragar (Merck) add. 0,5 l ddH ₂ O autoklavieren
TSS-Puffer	LB-Medium 10% Polyethylenglykol 6000 5% DMSO 50 mM MgSO ₄ ·x7H ₂ O

3.4 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Material	Hersteller
4x Rotiload Auftragspuffer	Roth
96-Well F96 MicroWellTM Platten	Thermo Scientific, Nunc
96-Well Fast Thermal Cycling Plates	Life Technologies
<i>Amersham ECL Western blotting detection reagent</i>	GE Healthcare
dNTP Set	New England Biolab, Fermentas
ECL-Filme (Fuji X-ray film SUPER RX)	Fujifilm
<i>Fast SYBR® Green Master Mix</i>	Applied Biosystems
Filterpapier	Whatman
<i>Lipofectamine® LTX with Plus™ Reagent</i>	Invitrogen
Nicht essentielle Aminosäuren (<i>MEM Non-Essential Amino Acids solution 100x</i>)	Gibco
<i>NucleoBond® PC500 Maxi Prep Kit</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin® Plasmid</i>	Macherey-Nagel

<i>NucleoSpin® RNA II Kit</i>	Macherey-Nagel
Protein A-Sepharose	GE Healthcare
Protein G-Sepharose	GE Healthcare
<i>PureYield™ Plasmid Miniprep System</i>	Promega
Random Hexamer Primer 0,2 µg/µl	Thermo Scientific
<i>Roti®-PVDF-Membran</i>	Roth
<i>Roti®-Quant Bradford-Kit</i>	Roth
Serum-freies Medium (<i>Opti-MEM®</i>)	Gibco
<i>TaqMan® Fast Universal PCR Mastermix</i>	Applied Biosystems
<i>TaqMan® PreAmp Cells-to-CT™ Kit</i>	Life Technologies

3.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Bgl II (10 U/µl)	Fermentas (# ER0081)
<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (CIAP; 1 U/µl)	Fermentas (# EF0654)
EcoRI (10 U/µl)	Fermentas (# ER0271)
HindIII (10 U/µl)	Fermentas (# ER0501)
MMLV Reverse Transkriptase (20 U/µl)	Fermentas (# EP0352)
Proteinase K (600-1000 U/ml)	Fermentas (# EO0491)
RNase A (10 mg/ml)	Fermentas (# EN0531)
T4 DNA Ligase (200 CEU/µl)	Fermentas (# EL0014)
T4 Polynukleotid Kinase (PNK; 10 U/µl)	Fermentas (# EK0031)

3.6 Inhibitoren

Inhibitor	Stocklösung	Hersteller
Actinomycin D	10 mg/ml in DMSO	Sigma (#A1410)
α-Amanitin	1 mg/ml in H ₂ O	Sigma (# A2263)
5,6-Dichlorobenzimidazol 1-β-D-ribofuranosid (DRB)	75 mM in DMSO	Sigma (# D1916)
5Z-7-Oxozeaenol	10 mM in DMSO	Tocris (# 66018-38-0)
PHA-408	100 mM in DMSO	Axon MedChem (# 1651)
Trichostatin A (TSA)	1 mg/ml in EtOH	Sigma (#T8552)

3.7 Marker

Marker	Hersteller
<i>GeneRuler DNA Ladder Mix</i>	Fermentas
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas

3.8 Plasmide

Plasmid	Herkunft
Bereits vorhandene Plasmide:	
pCS2+MT	AG Eisenman/Seattle
pCS2+MT mSin3a	AG Eisenman/Seattle
pCS2+MT mSin3a ΔHID	AG Eisenman/Seattle
pCS2+MT mSin3a N479	AG Eisenman/Seattle
pCS2+MT mSin3a PAH3+HID	AG Eisenman/Seattle
pEBB-HA	AG Schmitz/Giessen
pEBB-HA p65 wt	AG Schmitz/Giessen
pLKO.1	AG Braun/Bad Nauheim
pLKO.1 GFP	AG Braun/Bad Nauheim
pLKO.1 Scramble	AG Braun/Bad Nauheim
pLKO.1 shRNA Plasmide (Abschnitt 7.3)	AG Braun/Bad Nauheim
pLKO.1 shTAK1	Sigma (TRCN0000195533, NM_145332)
pSuper.puro (pSP)	AG Kracht/Giessen
pSuper.puro shFOS	AG Kracht Dr. Katja Handschick/Giessen
Im Rahmen der Arbeit generierte Plasmide:	
pSuper.puro shJunD	Johanna Sölch/Beatrice Pflüger
pSuper.puro shp65	Johanna Sölch
pSuper.puro shSin3a	Johanna Sölch

3.9 Real-Time PCR Sonden

(*TaqMan-Assays on Demand*, Applied Biosystems)

Sonde	RefSeq	Assay-ID
Human:		

<i>hActB</i>	NM_001101.3	Hs99999903_m1
<i>hCXCL2</i>	NM_002089.3	Hs00236966_m1
<i>hGusB</i>	NM_000181.3	Hs99999908_m1
<i>hIL8</i>	NM_000584.3	Hs00174103_m1
<i>hNFkBIA</i>	NM_020529.2	Hs00153283_m1
<i>hRELA (p65)</i>	NM_001145138.1	Hs00153294_m1
	NM_001243984.1	
	NM_001243985.1	
	NM_021975.3	
<i>hSIN3A</i>	NM_001145357.1	Hs00411592_m1
	NM_001145358.1	
	NM_015477.2	
Murin:		
<i>mActB</i>	NM_007393.3	Mm00607939_s1
<i>mCar13</i>	NM_024495.5	Mm00517925_m1
<i>mCcl2</i>	NM_011333.3	Mm00441242_m1
<i>mCcl20</i>	NM_016960.2	Mm00444228_m1
<i>mCcl7</i>	NM_013654.3	Mm00443113_m1
<i>mCxcl1</i>	NM_008176.3	Mm00433859_m1
<i>mCxcl10</i>	NM_021274.2	Mm00445235_m1
<i>mCxcl2</i>	NM_009140.2	Mm00436450_m1
<i>mCxcl3</i>	NM_203320.3	Mm01701838_m1
<i>mCxcl5</i>	NM_009141.3	Mm00436451_g1
<i>mIcam1</i>	NM_010493.2	Mm00516023_m1
<i>mNfkbia</i>	NM_010907.2	Mm00477798_m1
<i>mNfkbiz</i>	NM_001159394.1	Mm00600514_m1
	NM_001159395.1	
	NM_030612.3	
<i>mSin3a</i>	NM_001110350.1	Mm00488255_m1
	NM_001110351.1	
	NM_011378.2	
<i>mUbe2l3</i>	NM_009456.2	Mm00784559_s1

3.10 Oligonukleotide für shRNA-Klonierung und Sequenzierprimer

(Synthese von *eurofins mwg operon*)

Primer/Oligonukleotide	Sequenz
pSuper.puro shSin3a_A	gatccccgtgaacatctagcacagaattcaagagattctgtgctagatgtc actttttggaaa
pSuper.puro shSin3a_B	agcttttccaaaaaagtgaacatctagcacagaatctcttgaattctgtgctag atgttcacggg
pSuper.puro shp65_C	gatccccggattgaggagaaacgtaattcaagagattacgtttctctcaat cctttttggaaa
pSuper.puro shp65_D	agcttttccaaaaaaggattgaggagaaacgtaattctcttgaattacgtttctc ctcaatccggg
pSuper.puro shJunD_E	gatccccaagaacagagtgttcgattttcaagagaaatcgaacactctgttc tttttttgaaa
pSuper.puro shJunD_F	agcttttccaaaaaaagaacagagtgttcgatttctcttgaaaatcgaacac tctgttcttggg
pSP_shRNA_Seq	gtgtcactaggcgggaacac

3.11 ChIP Primer

(Synthese von *eurofins mwg operon*)

Primer	Entfernung zum TSS [bp]	sense	antisense
<i>IL8</i> locus:			
Promotor	0	aagaaaacttctgcatactccg	tggctttttatatcatcaccctac
Enhancer	-14.406	aaaggggattcaaagggaga	cttctccagggtccattcag
Enhancer <i>upstream</i>	-14.566	aaggaaacttttcttcccacga	gccattaggagccacaaaat
Enhancer <i>downstream</i>	-13.992	tacacagaggtcaccgtcca	ggttgctgaaacacagctca
Negativkontrolle	-899	atcatgggtcctcagaggtcagac	ggtgggagggaggtgttatcta g
<i>CXCL2</i> locus:			
Promotor	0	gtcagaccggacgtcact	accccttttatgcatgggtg
Enhancer	-17.865	aggcctctgtgatggaaatg	tccttctgttggtccattc
Enhancer <i>upstream</i>	-18.079	ggcctgggaacatttctgta	gaatcttttggtgctgacc

Enhancer	-17.434	ctttgaaccaaagccaagga	ctgaactagggaggggctct
<i>downstream</i>			
Negativkontrolle	-2.287	tgatgggctgattcttga	gccttgggcattaacagcta
<i>C8orf4</i> Locus:			
chr8 (39975970-39977680)			
Enhancer 1	-302	gcatgatattgtaaactgtgatg	tagggaggtggcttttct
Enhancer 2	0	ctggaatagtgacccaagg	gaggcgtcagtgtcctacc
Enhancer 3	+194	caaagcatgtgccttctttc	ttagtctgccttggagca
<i>PPAP2B</i> Locus:			
chr1 (56913983-56915265)			
Enhancer 1	0	tggaacctgggaagtgtgagac	taacctccaggaccttacg
Enhancer 2	+498	gcctgtgtactgtcagtgtga	atgaggcctcctggagaaac
<i>mCcl2</i> Locus:			
Promotor	0	cgagggtctgcacttactc	tcagtgtgaggtggctgggtg
Enhancer	-2.403	cccatgtgagagaactgtctgg	ggcaggtcagaggcagagta
murine	<i>upstream</i>	tttcatgcctctgagtgtgc	tttccctggctttgacctta
Negativkontrolle	von <i>mCxl5</i>		

3.12 Antikörper

3.12.1 Antikörper für ChIP

Antigen	Hersteller
ATF2	Santa Cruz (sc-6233)
cFos	Santa Cruz (sc-7202)
c-Jun	Santa Cruz (sc-1694)
Ehmt2	Abcam (ab40542)
Epc1	Abcam (ab112043)
FRA1	Santa Cruz (sc-605)
H3K27ac	Diagenode (pAb-174-050)
H3K27me3	Abcam (ab6002)

H3K4me1	Abcam (ab8895)
H3K9ac	Millipore (07-352)
H3K9me3	Abcam (ab8898)
HDAC2	Santa Cruz (sc-6296)
Histon H3	Abcam (ab1791)
Immunglobulin G (Kaninchen)	Cell signalling (#2729)
JunD	Santa Cruz (sc-74)
Kdm6a	Abcam (ab36938)
Ncoa1	Abcam (ab2859)
P(S2)-Pol II	Abcam (ab5095)
P(S5)-Pol II	Abcam (ab5131)
p300	Santa Cruz (sc-584)
p50	Santa Cruz (sc-114)
p65	Santa Cruz (sc-372)
Padi2	Abcam (ab16478)
Padi4	Sigma (P4749)
Phf21a	Santa Cruz (sc-98761)
Ring1	Abcam (ab32644)
RNA Pol II	Millipore (17-620)
Sin3a	Santa Cruz (sc-994)
Sin3b	Santa Cruz (sc-768)
Sirt7	Abcam (ab62748)
SMRT/NCOR2	Millipore (17-10057)
Suv420h1	Abcam (ab49251)
TAF II p250	Santa Cruz (sc-735)

3.12.2 Antikörper für Western Blot

Antigen	Hersteller	Ansatz
Primärantikörper:		
cFOS	Santa Cruz (sc-7202)	1:1000 in TBS-T, 5% BSA
Histon H3	Abcam (ab1791)	1:2000 in TBS-T, 5% Milch
IκBα	Cell Signaling, (#9242)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
JNK	Cell Signaling (#9252)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
JunD	Santa Cruz (sc-74)	1:1000 in TBS-T, 5% BSA
Kaninchen-IgG	Santa Cruz (sc-2027)	

Maus-IgG	Santa Cruz (sc-2025)	
MYC (9E10)	Roche (#11667149001)	1:500 in TBS-T, 5% Milch
P(S2)-Pol II	Abcam (ab5095)	1:10.000 in TBS-T, 5% Milch
P(S32)-I κ Ba	Cell Signaling (#2859)	1:1000 in TBS-T, 5% BSA
P(S5)-Pol II	Abcam (ab5131)	1:10.000 in TBS-T, 5% Milch
P(S536)-p65	Santa Cruz (sc-3033)	1:1000 in TBS-T, 5% BSA
P(T183/185)-JNK	Cell Signaling (#9251S)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
P(TY180/182)-p38	Zymed (36-8500)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
p38	Rzeczkowski <i>et al.</i> , 2011	1:1000 in TBS-T, 5% BSA
p50	Santa Cruz (sc-8414)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
p65	Santa Cruz (sc-372)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
Pan-Acetyl-Lysin	Cell Signaling (#9441)	1:500 in TBS-T (0,1%), 5% BSA
RNA Pol II	Millipore (17-620)	1:10.000 in TBS-T, 5% Milch
Sin3a	Abcam (ab3479)	1:2000 in TBS-T, 5% Milch
TAK1	Cell Signaling (#4505)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
Tubulin	Santa Cruz (sc-8035)	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
β -Actin	JLA20, Calbiochem	1:10.000 in TBS-T, 5% Milch
Sekundärantikörper:		
Polyklonal Ziege Anti-Kaninchen/HRP-konjugiert	Dako (P0448)	
Polyklonal Ziege Anti-Maus/HRP-konjugiert	Dako (P0447)	

3.13 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>E.coli</i> TOP 10 (Invitrogen)	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu)7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
<i>E.coli</i> XL1-Blue (Invitrogen)	F' Tn10(Tetr) proA +B + lacIq Δ (lacZ)M15I recA1 gyrA96 (Nalr) tbi-1bsdR17 (r-k m-k) glnV44 relA1 lac

3.14 Antibiotika

Antibiotikum	Finale Konzentration
Ampicillin (Amp)	100 μ g/ml

Puromycin (Puro)	1 µg/ml
------------------	---------

3.15 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HeLa (humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen)	ATCC
KB (humane, orale, epidermale Karzinomzellen [92])	ATCC
MEF (murine, embryonale Fibroblasten) HDAC3 ^{fl/-} (TA7); immortalisiert nach NIH 3T3 Protokoll [166]	[167]
MEF (murine, embryonale Fibroblasten) p65 ^{-/-} KO bzw. p65 ^{-/-} HA-p65 Wt rekonstituiert	[168]
MEF MK2/5	[169]

3.16 Rekombinante Proteine

rekombinantes Protein	Stocklösung in DMEM	Herkunft
humanes, rekombinantes IL-1α	10 µg/ml	Prof. Dr. Saklatvala, London, England

4 Methoden

4.1 Arbeiten mit Bakterien

4.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden chemisch-kompetente Bakterien hergestellt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit *E.coli XL1-Blue* bzw. *E.coli TOP10* angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Kultur in 50-150 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 kultiviert. Nach der Pelletierung (3000 rpm/ 4°C/ 10 min) wurden die Bakterien in 1/10 Volumen TSS-Puffer auf Eis resuspendiert und in 1,5 ml-Gefäßen als 100 µl Portionen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.2 Transformation

Für Transformationen wurden chemisch-kompetente *E.coli*-Stämme verwendet. Dazu wurden 100 µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und mit einem Ligationsansatz bzw. 10-100 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Heizblock. Der Ansatz wurde sofort wieder für 5 min auf Eis gestellt und anschließend mit 700 µl LB-Medium versetzt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C im Schüttler wurden verschiedene Verdünnungen des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit spezifischem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag konnten Einzelkolonien für Mini-oder Maxipräparationen verwendet werden.

4.1.3 Dauerkulturen von Bakterien

Für eine längerfristige Lagerung von Bakterienkulturen wurden Glycerin-Dauerkulturen angelegt. Dazu wurde die Kultur 1:1 mit Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dauerkulturen wurden bei -80°C gelagert.

4.2 Zellkultur

4.2.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zellen wurden als Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Aliquots zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, zentrifugiert (500 xg/ 4°C/ 5 min) und in

DMEM-Vollmedium resuspendiert. Die Suspension wurde dann in eine Zellkulturflasche mit vorgelegtem Medium überführt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA im Brutschrank abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend in 3 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen auf Eis aliquotiert. Die Röhrchen wurden dann bei -80°C eingefroren und später in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.2 Kultivieren und Passagieren von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen wurden im entsprechenden DMEM-Medium bei 37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle 4-5 Tage erfolgte das Passagieren der Zellen. Dazu wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und mit 1-2 ml Trypsin/EDTA im Brutschrank abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturgefäße mit der gewünschten Dichte verteilt. Zum Auszählen der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Unter dem Mikroskop wurden die vier Großquadrate der Kammer ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\sum \text{Zellen aller Großquadrate}}{4} \times 10^4$$

4.2.3 Stimulation und Ernten von Zellen

Je nach Versuchsbedingungen wurden adhärenente Zellen mit Stimulanzen und/oder Inhibitoren behandelt. Eine Stimulation mit IL-1 α [10 ng/ml] erfolgte für die im Ergebnisteil angegebenen Zeiten. Dazu wurde das Zytokin aufgetaut und als Verdünnung im Zellkulturgefäß zum Vollmedium zugegeben. Erfolgte eine Behandlung mit den Inhibitoren (5Z-7-Oxozeaenol [30 min/ 1 μ M], Actinomycin D [3 h/ 5 μ g/ml], α -Amanitin [16 h/ 5 μ g/ml], DRB [3 h/ 100 μ M], PHA-408 [30 min/ 5 μ M]) oder TSA [24 h/ 300 ng/ml]), dann wurden diese für die angegebene Zeit vor der Stimulation mit IL-1 α als Verdünnung im Zellkulturgefäß zum Vollmedium dazugegeben. Als Kontrollen dienten Behandlungen mit dem entsprechenden Lösungsmittel der Inhibitoren bzw. eine unbehandelte Probe.

Zum Ernten wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS auf Eis gewaschen, in PBS mit einem Gummischaber abgekratzt und bei 500 xg für 5 min bei 4°C pelletiert. Die Zellen wurden direkt lysiert oder als Pellet bei -80°C gelagert.

4.2.4 Transfektion

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA in Form von Plasmiden in eukaryotische Zellen eingebracht. Diese liegt entweder extra-chromosomal vor und kann nach dem Passagieren wieder verloren gehen (transiente Transfektion), oder sie wird aufgrund eines Selektionsdrucks oder über eine virale Transfektion in das Genom integriert (stabile Transfektion). In dieser Arbeit wurden die mit shRNA-Plasmiden transfizierten Zellen für 1-3 Tage mit Puromycin (1 µg/ml) anselektiert, um eine höhere *knockdown*-Effizienz zu erreichen. Es wurden keine stabilen Zelllinien generiert.

4.2.4.1 Transiente Transfektion mit CaPO_4

Bei der Transfektion mit Kalziumphosphat wird die DNA mit einem Phosphat-haltigen Puffer und Kalziumchlorid gemischt. Dabei fällt Kalziumphosphat aus, welches an die DNA bindet. Diese Präzipitate setzen sich auf der Zelloberfläche ab und werden über Endozytose aufgenommen.

Folgende Angaben beziehen sich auf eine 145 cm² -Zellkulturschale:

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion je nach Transfektionsdauer ($2\text{-}3 \times 10^6$ Zellen/Schale) in 20 ml Vollmedium ausgesät. Vor der Transfektion wurde das Medium auf 15 ml reduziert und der Transfektionsansatz unter Schwenken zugetropft. Der Ansatz für eine Schale setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenz	Menge
Wasser	2,25 ml
2x HEBS	2,5 ml
DNA	80-100 µg
CaCl_2 (2M)	315 µl

Dabei wurden Wasser, HEBS und DNA gemischt und kurz gevortext. Die Bildung der Präzipitate erfolgte durch tropfenweise Zugabe des kalten Kalziumchlorids. Der Ansatz wurde erneut gevortext und für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um ihn anschließend auf die Zellen zu geben. Nach 4-6 h Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Glycerolschock bei HeLa-Zellen, um die Präzipitat-Aufnahme zu steigern. Dazu wurden die Zellen für 3 min mit 8 ml Schockmedium inkubiert und anschließend dreimal mit warmem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 20 ml frischem Vollmedium wurden die Zellen über Nacht weiter im Brutschrank kultiviert. Bei Transfektionen, die zur Überexpression von Proteinen dienten, wurden die Zellen 24 h nach der Transfektion ggf. behandelt und

geerntet. Für die Generierung von *knockdown*-Zellen mittels shRNA-Plasmiden wurden die Zellen für 24-72 h unter Puromycin (1 µg/ml) weiter kultiviert. Dabei erfolgte je nach Zelldichte ein Passagieren der Zellen. Um störendes Kalziumphosphat auf den Zellen zu entfernen, wurden die Zellen vor dem Ablösen einmal mit PBS/EDTA (0,4 mg/l) gewaschen. Einen Tag vor dem Ernten wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um tote Zellen aus dem Medium zu entfernen.

4.2.4.2 Transiente Transfektion mit Lipofectamine

MEF (TA7) Zellen wurden für einen shRNA Screen mit *Lipofectamine LTX with PLUS reagent* transfiziert. Dazu wurden $3,3 \times 10^4$ Zellen in einer 48-Well-Platte in 300 µl DMEM ohne Antibiotika mit zugesetzten nicht-essentiellen Aminosäuren ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion. Dazu wurden 270 ng pLKO.1-shRNA bzw. Vektorkontrollen, 270 µl *PlusReagent* und 1 µl *Lipofectamine LTX* in 40 µl Serum-freiem Medium (Opti-MEM) in einem 1,5 ml-Gefäß gemischt. Dieser Transfektionsansatz wurde unter Schwenken auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden für 72 h weiter im Inkubator kultiviert, wobei nach 24 und 48 h ein Mediumwechsel mit Puromycin (1 µg/ml) erfolgte. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 bzw. 3 h mit IL-1α (10 ng/ml) stimuliert und geerntet.

4.3 Arbeiten mit RNA und DNA

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

4.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien zu gewinnen, wurden Übernachtskulturen in 4 ml (Minipräparation) bzw. 150 ml (Maxipräparation) LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angesetzt. Diese wurden im Schüttelinkubator bei 37°C für ca. 16 h kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Kits der Firmen Promega (*PureYield™ Plasmid Miniprep System*) und Machery & Nagel (*NucleoSpin® Plasmid* bzw. *NucleoBond® PC500*) nach den Angaben der Hersteller aufgearbeitet. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

4.3.1.2 Isolierung von RNA

Für Genexpressionsanalysen mittels Real-Time PCR und Microarray-Analysen wurde die Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien isoliert. Dafür wurde das *NucleoSpin® RNA II* Kit von

Machery & Nagel nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die RNA wurde dabei in 30-60 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.3.2 Reverse Transkription (RT)

RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Das Umschreiben der cDNA wurde durch das Enzym MMLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) Reverse Transkriptase mit Hilfe von Random Hexamer Primern katalysiert.

Zusammensetzung eines 20 µl-Ansatzes:

Reagenz	Menge
RNA	1 µg
RT-Puffer (5x)	4 µl
dNTP Set (10 mM)	0,5 µl
Random Hexamer Primer	0,5 µl
MMLV Reverse Transkriptase	0,5 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde für die reverse Transkription im Thermocycler verwendet:

Temperatur [°C]	Zeit [min]
23	10
37	60
95	5
4	∞

Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt oder konnte direkt in der Real-Time PCR eingesetzt werden.

4.3.3 Quantitative Real-Time PCR

In dieser Arbeit wurde die Real-Time PCR eingesetzt, um cDNA und CHIP-DNA Proben zu analysieren. Diese Methode ermöglicht eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR mittels Fluoreszenzfarbstoffen.

4.3.3.1 *TaqMan*-basierendes System

Für cDNA Proben wurden *TaqMan*-Assays *on Demand* der Firma Applied Biosystems genutzt, welche alle benötigten PCR-Reagenzien, sowie eine Sequenz-spezifische Sonde enthalten. Diese Sonde ist am 5'-Ende an den Reporterfarbstoff FAM (Carboxyfluorescein) gekoppelt und besitzt am 3'-Ende den Quencher TAMRA (Tetramethylrhodamin). Während der PCR bindet die Sonde an ihre komplementäre Zielsequenz. Durch die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird dabei die lichtinduzierte Fluoreszenz des Reporters über Fluoreszenzenergietransfer (FRET) auf den Quencher übertragen und kann nicht gemessen werden. Die *Taq*-Polymerase unterbricht diese räumliche Nähe während der Synthese des komplementären Stranges durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität und führt so zur Detektion des Fluoreszenzsignals. Das Signal nimmt dabei proportional zur Menge der PCR-Produkte zu und ermöglicht eine Berechnung der Ausgangsmenge. Dabei wird eine relative Quantifizierung verwendet, indem ein Referenzgen („Haushaltsgen“) parallel gemessen und verrechnet wird ($\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode). Der ermittelte Ct-Wert (*Cycle Threshold*) beschreibt den Zyklus der PCR, in dem das Signal signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Für eine Normalisierung werden die Ct-Werte von Zielgen und nicht-reguliertem „Haushaltsgen“ voneinander subtrahiert (ΔCt). Anschließend erfolgt die Berechnung der differentiellen Expression durch die Differenz zweier ΔCt -Werte ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Die unterschiedliche Expression wird dann als n-fache Expression mit $n=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ angegeben.

In dieser Arbeit wurden die „Haushaltsgene“ *hACTB*, *hGUSB*, *mActB* und *mUbe2l3* zur Normalisierung verwendet und die behandelten/stimulierten Proben auf die unbehandelten/unstimulierten Kontrollen bezogen. Zur Analyse diente das *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System*. Die cDNA-Proben für jede PCR-Reaktion wurden als Doppelwerte in 96-Well-Platten pipettiert.

Zusammensetzung eines 20 μl Ansatzes:

Reagenz	Menge
cDNA	2 μl
<i>TaqMan FAST 2x Universal PCR Master Mix</i>	10 μl
<i>TaqMan Assays on Demand</i>	0.5 μl
Nuklease-freies Wasser	7.5 μl

Real-Time PCR Temperaturprofil:

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [s]	Zyklen
---------	-----------------------------------	----------	--------

Initiale Denaturierung	95	20	1
Denaturierung	95	3	40
Annealing/Elongation	60	30	

4.3.3.2 SYBR Green-basierendes System

Zur Analyse von ChIP-DNA wurde das *SYBR Green*-basierende System verwendet. Der Cynin-Fluoreszenzfarbstoff bindet an doppelsträngige DNA. Auch hier korreliert die Zunahme des Fluoreszenzsignals mit dem Anstieg der PCR-Produkte. Der Farbstoff differenziert jedoch nicht zwischen spezifischem PCR-Produkt und eventuell auftretenden Nebenprodukten oder Primer-Dimeren. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse wurde am Ende der PCR die Spezifität der verwendeten Primer überprüft. Durch einen kontinuierlichen Temperaturanstieg wird dabei der DNA-Doppelstrang bei seiner spezifischen Schmelztemperatur aufgeschmolzen. Der Farbstoff wird freigesetzt und eine Änderung des Fluoreszenzsignals registriert. Eine Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurde nur dann vorgenommen, wenn die Schmelzkurvenanalyse eindeutig ein einzelnes PCR-Produkt ergab.

Zusammensetzung eines 20 µl Ansatzes:

Reagenz	Menge
ChIP-DNA	2 µl
<i>FAST SYBR Green PCR Master Mix</i>	10 µl
Primer sense (10 µM)	0,5 µl
Primer antisense (10 µM)	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	7 µl

Das verwendete PCR-Temperaturprofil entsprach dem der *TaqMan*-basierenden PCR. Die ermittelten Ct-Werte wurden in folgende Formel eingesetzt, um die Menge an DNA als Prozent des eingesetzten Inputs anzugeben:

$$\frac{X\% \text{ Input} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{2^{Ct \text{ Input}}} = \frac{100\%}{2^{Ct \text{ IP}}}$$

$$X\% \text{ Input} = \frac{100\% \times 2^{Ct \text{ Input}}}{2^{Ct \text{ IP}} \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \frac{100\%}{\text{Verdünnungsfaktor}} \times 2^{Ct \text{ Input} - Ct \text{ IP}}$$

Da in der Regel in der IP ein höherer Ct Wert aufgrund einer niedrigeren DNA Menge zu erwarten ist, wird der ΔCt Wert folgendermaßen umgeformt und mit einem negativen Vorzeichen versehen:

$$= \frac{100\%}{\text{Verdünnungsfaktor}} \times 2^{-(Ct\ IP - Ct\ Input)}$$

Eingesetzter Input	Verdünnungsfaktor
100%	1
50%	2
10%	10
1%	100

Da 1% des Inputs als Referenz eingesetzt wurde, lässt sich diese Formel vereinfachen:

$$X\% \text{ Input} = \frac{100\%}{100} \times 2^{-(Ct\ IP - Ct\ Input)} = 2^{-(Ct\ IP - Ct\ Input)}$$

4.3.4 mRNA-Expressionsanalyse mittels *PreAmp Cells-to-Ct_{TM}* Kit

Die Aufarbeitung der Proben aus dem in dieser Arbeit durchgeführten shRNA Screen erfolgte mittels *PreAmp Cells-to-Ct_{TM}* Kit von ABI nach einem adaptiven Protokoll. Mit Hilfe des Kits konnte cDNA aus einer kleinen Menge Zelllysat gewonnen werden. Diese wurde in einem Pre-Amplifikationsschritt mit Gen-spezifischen Primern vervielfältigt und anschließend in einer *TaqMan*-basierenden Real-Time PCR analysiert.

Die Zellen wurden in 1,5 ml-Gefäßen auf Eis geerntet und in 12,5 µl Lysepuffer-Ansatz (12,375 µl Lysepuffer + 0,125 µl DNase) lysiert. Die Proben wurden gevortext, kurz abzentrifugiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1,25 µl Stopplösung wurde die Lyse beendet und die Proben erneut gevortext. Die Lysate konnten direkt auf Eis weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden. Im zweiten Schritt erfolgte das Umschreiben der RNA in cDNA, wobei kein RNA-Isolationsschritt wie bei einer herkömmlichen RT-PCR nötig war. Die RT-Reaktion wurde als 10 µl-Ansatz durchgeführt:

Reagenz	Menge
Lysat	4,5 µl
RT-Puffer (2x)	5 µl
RT-Enzym Mix (20x)	0,5 µl

Die reverse Transkription erfolgte bei folgendem Temperaturprofil im Thermocycler:

Temperatur [°C]	Zeit [min]
-----------------	------------

37	60
95	5
4	∞

Im nächsten Schritt wurde die gewonnene cDNA mit Gen-spezifischen Primern (*TaqMan Assay-On-Demand*) preamplifiziert. Dazu wurden die *TaqMan*-Assays 1:100 in TE-Puffer verdünnt und in folgendem 10 µl-Ansatz verwendet:

Reagenz	Menge
cDNA (RT-Produkt)	2,5 µl
<i>TaqMan</i> -Assay Pool (1:100)	2,5 µl
<i>TaqMan</i> PreAmp MasterMix (2x)	5 µl

TaqMan-Assay Pool: *mUbe2l3*, *mActB*, *mCycl1*, *mCycl2*, *mCycl3*, *mCycl5*, *mCycl10*, *mIL6*, *mCCL1*, *mCCL2*, *mCCL7*, *mCCL11*, *mCCL20*, *mNfkbiz*, *mNfkbia*, *mCar13*, *mMcm7*, *mEvl*

Temperaturprofil für PreAmp-PCR:

Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
95	10 min	1
95	15 s	15
60	4 min	

Die Proben konnten bei -20°C gelagert oder direkt in der Real-Time PCR eingesetzt werden. Dazu wurden die Proben 1:5 in TE-Puffer verdünnt.

20 µl Real-Time PCR Ansatz:

Reagenz	Menge
PreAmp-RT-Produkt (1:5)	4 µl
<i>TaqMan FAST 2x Universal PCR Master Mix</i>	10 µl
<i>TaqMan Assays on Demand</i>	1 µl
Nuklease-freies Wasser	5 µl

Die Proben wurden als Doppelwerte in 96-Well Platten pipettiert. Die Analyse erfolgte mittels *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System* nach dem Temperaturprofil der Real-Time PCR (Abschnitt 4.3.3.1).

4.3.5 mRNA-Expressionsanalyse mittels Microarray

Neben mRNA-Expressionsanalysen über RT-qPCRs mit Einzelsonden, wurden Microarrays durchgeführt. Dazu wurden MEF (TA7) Zellen für 30 min mit IL-1 α (10 ng/ml) stimuliert und die RNA, wie in Abschnitt 4.3.1.2 beschrieben, isoliert. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Die Microarray-Analyse wurde von Dr. Oliver Dittrich-Breiholz (Institut für Physiologische Chemie, MHH Hannover) durchgeführt. Es folgte ein *Whole Mouse Genome Oligo Microarray V2'* (G4846A, ID 026655, Agilent Technologies), welcher 44397 Oligonukleotidsonden enthielt. Die cRNA-Synthese erfolgte mit dem *Quick Amp Labeling kit, one color* (#5190-0442, Agilent Technologies). Die anschließende cRNA Fragmentierung, Hybridisierung und die Waschschrte erfolgten nach dem Protokoll *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol V5.7* (Agilent Technologies, 2008). Die *Arrays* wurden in einem *Agilent Micro Array Scanner G2565CA* mit der Pixelauflösung 5 mm, Bittiefe 20 gemessen. Die Fluoreszenzdaten konnten mit der *Feature Extraction Software V10.7.3.1* und einem Standardextraktionsprotokoll verrechnet werden. Die erhobenen Messwerte wurden in Genespring GX Version 11.5.1 (Agilent Technologies) von Dr. Axel Weber (Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie, JLU Giessen) normalisiert und analysiert [92]. Anschließend wurden die 50 am stärksten durch IL-1 regulierten Gene (Log2-Werte der Mittelwerte) in absteigender Reihenfolge mittels Farbcode als *Heatmap* (MultiExperimentViewer Version 4.8.1) dargestellt.

4.3.6 Klonierung von shRNA-Vektoren

Um einen transienten *knockdown* von p65 und Sin3a in HeLa Zellen zu generieren, wurden shRNA-Vektoren kloniert. sh(*short-hairpin*)RNAs bilden eine Haarnadelstruktur aus und können verwendet werden, um die Expression des Zielgens über RNA-Interferenz (RNAi) stillzulegen. Als Ausgangsvektor diente der pSuper.puro Leervektor, der durch einen BglII/HindIII-Restriktionsverdau linearisiert wurde.

Zusammensetzung eines 20 μ l Ansatzes:

Reagenz	Menge
1 μ g pSuper.puro (1 μ g/ μ l)	1 μ l
1x Restriktionspuffer <i>Red</i>	2 μ l
HindIII (10 U)	1 μ l
BglII (20 U)	2 μ l
Wasser	14 μ l

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Hitze-Inaktivierungsschritt für 20 min bei 65°C wurde 1 µl CIAP hinzugegeben, um die offenen Enden des linearisierten Vektors zu dephosphorylieren. Nach 30 min bei 37°C erfolgte eine Hitze-Inaktivierung für 15 min bei 85°C. Der linearisierte Vektor wurde mit dem *NucleoSpin®Gel and PCR Clean-Up* Kit von Macherey & Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 15 µl Wasser eluiert.

Die synthetisierten 64-mer Oligonukleotide (Abschnitt 3.10), welche die Zielsequenz der shRNAs beinhalten, wurden hybridisiert, anschließend phosphoryliert und schließlich in den offenen Vektor ligiert. Für die Hybridisierung wurde jeweils 1 µl [3 µg/µl] der Oligo-Paare mit 5 µl T4 PNK Puffer A und 43 µl Wasser gemischt, für 4 min bei 95°C und 10 min bei 70°C erhitzt und dann schrittweise abgekühlt. Für die anschließende Phosphorylierung der doppelsträngigen Oligos wurde folgender 10 µl-Ansatz pipettiert:

Reagenz	Menge
ds Oligo-Ansatz	2 µl
T4 PNK Puffer A	1 µl
ATP (1 mM)	1 µl
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	1 µl
Wasser	5 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und für 10 min bei 70°C inaktiviert.

Für die Ligation von linearisiertem Vektor und den Oligos wurde folgender Ansatz pipettiert:

Reagenz	Menge
ds, phosphorylierte Oligos	2 µl
linearisierter, dephosphorylierter pSuper.puro Vektor	3 µl
T4 Ligase Puffer	1 µl
T4 Ligase	1 µl
Wasser	3 µl

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne dsOligos. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C wurde 1 µl BglII hinzugefügt und der Ansatz für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Da die BglII-Schnittstelle des Vektors bei einer erfolgreichen Insertion der Oligos zerstört wurde, reduzierte man so die Anzahl an negativen Klonen. Der gesamte Ligationsansatz wurde für eine Transformation in *E.coli XL1-Blue* verwendet. Nach einer Minipräparation von einzelnen Klonen wurde ein Testverdau mit EcoRI und HindIII durchgeführt. Positive Klone zeigten ein 285 bp großes Fragment,

negative Klone ohne Insert ein Fragment mit 221 bp. Die Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und Plasmide positiver Klone (40 µl mit 100 ng/µl) wurden zur Sequenzierung versendet, welche von der Firma LGC Genomics durchgeführt wurde. Dazu wurde der Sequenzierprimer pSP_shRNA_seq (Abschnitt 3.10) verwendet.

4.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse eines Restriktionsverdaus (shRNA-Plasmid Klonierung) oder von Scherungsgelen (ChIP und ChIP-seq) wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurden 1,5 % Agarose-Gele mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Nukleinsäuren wurden bei 100 V für 30-45 min in 1x TAE Puffer aufgetrennt. Als Größenvergleich diente ein DNA-Marker (*gene Ruler DNA-ladder Mix*). Die Auswertung erfolgte optisch mittels *Gel iX Imager UV-Transilluminator* (Intas).

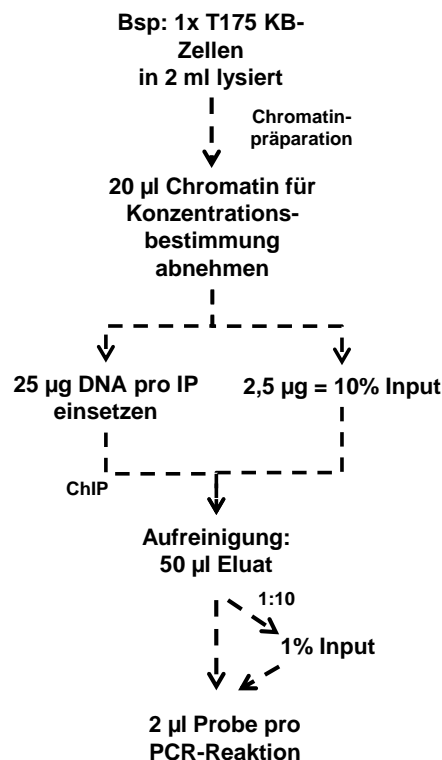
4.3.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) dient zur Detektion von Transkriptionsfaktoren und Ko-Faktoren am Chromatin, sowie zur Analyse von Histonen und deren Modifikationen. Dazu werden die zu untersuchenden Proteine aus einem zuvor generierten Chromatin-Lysat immunopräzipitiert, wobei DNA und Proteine miteinander vernetzt vorliegen. Um die Bindung der präzipitierten Proteine am Chromatin zu lokalisieren, wird die ko-präzipitierte DNA mittels quantitativer Real-Time PCR und spezifischen Primerpaaren analysiert.

Es wurden KB-, HeLa-Zellen und MEFs verwendet, die je nach Experiment zuvor behandelt wurden. Je nach Größe des Experiments wurden die Zellen in 1-2 T175-Zellkulturflaschen (KB) bzw. 2-4 143cm²-Zellkulturschalen (HeLa/MEF) geerntet. Um den Ist-Zustand des Chromatins zu bewahren, wurde dem Medium 1% Formaldehyd zugesetzt, wodurch Proteine und DNA quervernetzt wurden (*Crosslinking*). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 M Glycin für 5 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Die Zellen konnten dann mit einem Zellschaber im Medium abgekratzt und zentrifugiert (1610 xg/ 4°C/ 5 min) werden. Das Pellet wurde in kaltem PBS mit PMSF gewaschen und erneut pelletiert (1610 xg/ 4°C/ 5 min). Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen je nach Pelletgröße in 1-3 ml ChIP Lysepuffer für 10 min auf Eis. Die DNA wurde durch Sonifikation im Bioruptor (Diagenode) geschert (4°C, 28 Zyklen, 30 s ON/30 s OFF, Power high), so dass 200-500 bp Fragmente entstanden. Die Scherung konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Durch Zentrifugation wurden unlösliche Bestandteile entfernt (16100 xg/ 4°C/ 15 min) und das Chromatin bei -80°C gelagert. Um eine Konzentrationsbestimmung durchzuführen, wurden 20 µl des Chromatins mit 100 µl TE-Puffer und 1 µl RNase A versetzt und bei 37°C für 30 min

inkubiert. Nach Zugabe von 1% SDS und 3,8 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurden die Proben für weitere 2 h bei 37°C und anschließend über Nacht bei 65°C inkubiert. Durch diese Behandlung wurden RNA und Proteine verdaut, sowie das *Crosslinking* aufgehoben. Die Test-Proben wurden mit Hilfe des Kits *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* (Macherey & Nagel) aufgereinigt. Dazu wurden die Proben zunächst in 240 µl NTB Puffer (Macherey & Nagel) resuspendiert und auf die Silica-Säule geladen. Nach einem Waschschriff mit 700 µl Waschpuffer, sowie Trocknung der Säule durch Zentrifugation, erfolgte die Elution in 50 µl Elutionspuffer. Die DNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop gemessen (X ng/µl) und so die Konzentration der Ausgangslysat zurückgerechnet:

$$\text{Chromatinkonzentration [ng/µl]} = \frac{X \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 50 \mu\text{l}}{20 \mu\text{l}}$$



Für eine ChIP Probe wurde 25 µg Chromatinlysat eingesetzt. Dazu wurde das Chromatin auf Eis aufgetaut und die berechnete Menge in 900 µl Dilutionspuffer (ca. 1:10) verdünnt. Der Ansatz wurde auf zuvor in Dilutionspuffer präequilibrierte Protein A/G-Sepharose Beads gegeben (30 µl Mix) und mit 2 µg IgG (10 mg/ml) gemischt. Das *Preclearing* erfolgte rotierend bei 4°C für mindestens 2 h. Parallel dazu wurde 10% der eingesetzten Chromatinmenge (Input) in Reaktionsgefäße überführt und bis zum nächsten Tag bei -20°C gelagert. Die Beads wurden anschließend abzentrifugiert (2000 rpm/ 4°C/ 1 min) und der Überstand mit vorgereinigtem Chromatin in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Dann erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper bei 4°C rotierend über Nacht. Je nach

Antikörper wurden 1-3 µg in einer IP eingesetzt. Am folgenden Tag wurden die Proben erneut auf präequilibrierte Protein A/G-Sepharose Beads (30 µl Mix) gegeben und für mindestens 2 h bei 4°C rotiert. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren, erfolgten mehrere Waschschrte. Dazu wurden die Beads pelletiert (2000 rpm/ 4°C/ 1 min) und mit je 900 µl Waschpuffer (1x Niedrigsalzpuffer, 1x Hochsalzpuffer, 1x LiCl-Puffer und 2x TE-Puffer) gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrten rotierten die Proben bei 4°C für 5 min. Die gewaschenen Beads, sowie die 10% Input-Proben, wurden dann in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und, wie bereits bei den Test-Proben zur Konzentrationsbestimmung beschrieben, behandelt, um RNA und Proteine zu entfernen und das *Crosslinking* aufzuheben. Auch die Aufreinigung und Elution mittels *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-Up* Kit (Macherey & Nagel) erfolgte nach den oben beschriebenen Angaben. Die in 50 µl eluierte ChIP-DNA wurde bis zur Verwendung in der Real-Time PCR bei -20°C gelagert. Die 10% Input-Proben wurden für den Einsatz in der Real-Time PCR 1:10 verdünnt (1%).

4.3.9 ChIP-DNA Sequenzierung (ChIP-seq) und bioinformatische Analysen

Mit der so gewonnenen ChIP-DNA wurden auch Hochdurchsatz-Sequenzierungen durchgeführt. Dabei wurde die ermittelte Sequenz mit dem menschlichen Genom verglichen, was eine genomweite Analyse von Bindungsereignissen am Chromatin erlaubte. Die Proben wurden dabei wie unter 4.3.8 beschrieben generiert, die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte jedoch in 50 µl Wasser. Für die Sequenzierung wurden 10 ng ChIP-DNA in 30 µl Gesamtvolumen benötigt. Diese Konzentration wurde durch das Zusammenführen und die Aufkonzentrierung mehrerer Proben erreicht. Zur weiteren Verarbeitung und Sequenzierung wurden die Proben an das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig versandt (Dr. Michael Jarek und Dr. Sabin Bhuj). Dort wurden die *Sequencing Libraries* mit dem *Illumina ChIP-seq DNA Sample Prep* Kit nach Herstellerangaben erstellt. Die *Cluster* wurden mit der *Cluster station* von Illumina generiert und die Sequenzierung erfolgte nach dem Protokoll des *Genome Analyzer IIx*. Mittels *Genome Analyzer Pipeline Analysis software 1.8* (Illumina) wurden die Fluoreszenzsignale zu Sequenzen prozessiert. Die bioinformatische Auswertung der Daten wurde von Dr. Marek Bartkuhn (Institut für Genetik, JLU Giessen) durchgeführt. Dabei wurde die Qualität der Daten mit *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) überprüft und die Sequenzen (*reads*) mittels *Bowtie* auf die Genom-Referenz *hg19 RefSeq* Annotationen aus *Illuminas iGenome repository* übertragen. Dabei wird die „-k Option“ auf 1 gesetzt [170, 171]. Es wurden nur *reads* weiter verwendet, die eindeutig einer Stelle im Genom zugeordnet werden konnten. Für die Generierung von Bindungsprofilen und Definition von Höchstpunkten (*peaks*) wurden die Programme *MACS v1.41* [172] und *CCAT* [173] herangezogen. Alle Analysen, die über die Standardeinstellungen hinaus gingen, wurden mittels *R/BioConductor*

(<http://www.bioconductor.org>) durchgeführt [174]. Bindungs-Höchstpunkte wurden mit einem Poisson p-Wert von unter 10^{-5} und einem FDR von weniger als 5% als *peak* definiert. Für diese *peaks* wurde die Überschneidung zwischen verschiedenen ChIP-DNA Proben analysiert. Dabei galt eine Überschneidung zwischen zwei *peaks* bei einem minimalen Überschneidungsintervall von 1bp. Um nun Differenzen in der Bindung eines Faktors zwischen verschiedenen ChIP-Proben zu bestimmen, wurden alle Bindestellen unter verschiedenen Bedingungen zusammengeführt und die Anzahl der *reads* für diese Intervalle verglichen. Zur Untersuchung von Überlappungen in den Bindungsprofilen unterschiedlicher Faktoren wurde das Programm *BedTools suite* mit eingeschalteter *Cluster*-Option verwendet. Um die Bindungsprofile der untersuchten Faktoren zu visualisieren, wurden die regelmäßigen Abdeckungsvektoren (*coverage vectors*) berechnet und als Millionen *reads* normalisiert. Mit Hilfe dieser Daten wurden interessante Regionen unterschiedlicher Größen bestimmt. Die *Bin*-Größe (verwendetes Fenster) lag dabei bei 100 bp und die durchschnittliche *read*-Dichte wurde für jede Position kalkuliert. Daraus wurden kumulative Bindungsprofile erstellt. Nach einer zusätzlichen Glättung der Daten (Kernel Regressionsschätzung) konnten die Profile im *Integrative Genomics Viewer* (IGV V.2.3) dargestellt werden [175].

4.4 Arbeiten mit Proteinen

4.4.1 Herstellung von Ganzzelllysaten eukaryotischer Zellen

Je nach Fragestellung wurden unterschiedliche Zellyse-Protokolle zur Immunodetektion von Proteinen mittels Westernblot durchgeführt. Dabei wurde stets auf Eis gearbeitet, um eine Proteindegradation zu vermeiden.

4.4.1.1 Speziallysate

Die geernteten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen Speziallysepuffer resuspendiert, kurz gevortext und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 10.600 rpm. Der Überstand wurde direkt zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt oder bei -80°C gelagert.

4.4.1.2 Bohmann/Weiss-Lysate

Die geernteten Zellen wurden in einem entsprechenden Volumen Bohmann/Weiss-Lysepuffer [165] lysiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Zum vollständigen Aufschließen der Zellen erfolgte eine Sonifikation (3x 20 min) mittels Branson Sonifier. Um unlösliche

Bestandteile zu entfernen, wurden die Lysate für 20 min bei 100.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte direkt zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt oder bei -80°C gelagert werden.

4.4.1.3 Fraktionierte Lyse

Zur Trennung von Proteinfractionen in die zytosolische (C), lösliche (N1) und unlösliche/Chromatin (N2) Kernfraktion, wurde die fraktionierte Lyse durchgeführt [108]. Dazu wurde das geerntete Zellpellet sofort in Lysepuffer I resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 1 min bei 2300 xg bei 4°C. Der Überstand enthielt die zytosolischen Proteine (C) und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das restliche Pellet wurde in Lysepuffer II (Volumen wie Lysepuffer I) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben zweimal kurz gevortext. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 20.400 xg für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde erneut in ein Reaktionsgefäß überführt und enthielt die löslichen Kernproteine (N1). Um die unlöslichen Proteine in der Chromatinfraktion (N2) zu erhalten, wurde das restliche Pellet in Lysepuffer III (Volumen wie Lysepuffer I und II) kräftig gevortext. Für einen kompletten Zellaufschluss wurden die Proben aus N2 10-30 s sonifiziert (Branson Sonifier, Stufe 2) und im Anschluss 50 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (20.400 xg/ 4°C/ 5 min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate der drei Fraktionen (C, N1 und N2) wurden nun zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet. Die Lysate konnten bei -80°C gelagert werden.

4.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Bradford durchgeführt. Die Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung. Dadurch kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm (Bradford 1976).

Die Lysate wurden in PBS verdünnt (1:200-1:400) und als 100 µl-Triplicate in eine 96-Well-Platte pipettiert. Parallel wurde eine BSA (*bovine serum albumin*)-Standardreihe vorgelegt (0-35 µg/ml in PBS). Dann wurden 100 µl der Farbstofflösung zugegeben. Nach etwa 5 min Inkubation bei Raumtemperatur, erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm im *Microplate Spectrophotometer*. Die Konzentration der Probe wurde anhand der BSA-Standardreihe berechnet. Für das Laden eines SDS/Polyacrylamid-Gels wurden 50 µg Protein pro Probe verwendet.

4.4.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

In einem elektrischen Feld können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dazu werden die Protein-haltigen Lysate bei 95°C in einem reduzierenden Probenpuffer denaturiert und auf ein SDS/Polyacrylamid-Gel geladen. Die nun negativ geladenen Proteine wandern zur Anode, wobei kleine Proteine schneller wandern als große. Bei einer diskontinuierlichen SDS-PAGE werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel mit neutralem pH gesammelt, um anschließend in einem Trenngel mit basischem pH aufgetrennt zu werden.

In Abhängigkeit der Größe der untersuchten Proteine wurden 7,5-10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet.

Lösung [ml]	7,5%iges Trenngel	8%iges Trenngel	10%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
ddH ₂ O	5,91	5,41	3,65	5,61
50% (v/v) Glycerol	2,38	2,38	2,38	0,9
Trenngelpuffer	10,12	10,12	10,12	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	1,26
2% (w/v) SDS	1,32	1,32	1,32	0,5
30% (w/v) Acrylamid	6,6	7,04	8,8	1,68
40% (w/v) APS	0,04	0,04	0,04	0,03
TEMED	0,027	0,027	0,027	0,02
Gesamt	26,4	26,4	26,4	10

Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde dieses mit Sammelgel überschichtet. Die Proben wurden in 1x Roti-Load Auftragspuffer für 10 min bei 95°C aufgekocht, abzentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels geladen. Als Größenmarker wurde 10 µl *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 50 mA/Gel für 2½ h in 1x Laemmli-Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel für einen Westernblot verwendet.

4.4.4 Westernblot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels *semi-dry* Westernblot auf eine Membran übertragen, um sie anschließend über eine Immunodetektion zu visualisieren. Dazu wurde das Gel auf eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran gelegt und von oben und unten mit jeweils zwei Lagen Whatman Papier bedeckt. Der Stapel wurde in 1x Blotpuffer

getränkt und in der Blotkammer eingespannt. Der Transfer erfolgte für 2½ h bei 0,75 mA/cm². Im Anschluss wurde die Membran mit einer 0,1%igen Ponceau S-Lösung gefärbt, um die Übertragung der Proteine zu überprüfen. Nach der Entfärbung mit TBST folgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran mit 5% Magermilch in TBST (Blocken) für 1 h bei Raumtemperatur. Für eine Immunodetektion spezifischer Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einer Primärantikörper-Lösung (1:500-1:10.000 in 5% Magermilch/TBST oder 5% BSA/TBST) geschwenkt. Nach mehrmaligem Waschen der Membran in TBST (4x 5 min) folgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000-1:5000 in 5% Milchpulver/TBST) für 1-3 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde erneut in TBST gewaschen (4x 5 min) und in ECL-Reagenz für 1 min inkubiert. Durch die Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit dem ECL-Reagenz konnte die freiwerdende Energie in Form von Licht auf einem Film detektiert werden. Dieselbe Membran konnte für weitere Antikörper-Inkubationen in Methanol reaktiviert werden. Nach dem Blocken in 5% Milchpulver/TBST wurde die Membran über Nacht bei 4°C im Primärantikörper geschwenkt.

4.4.5 Ko-Immunopräzipitation

Zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Ko-Immunopräzipitation durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein spezifischer Antikörper zu einem Zelllysate zugegeben. Dieser bindet an sein Antigen und wird an Protein A- oder G-Sepharose Beads gekoppelt. Unter optimalen Bedingungen können so auch ko-immunopräzipitierte Interaktionspartner des isolierten Antigens nachgewiesen werden.

Pro Ansatz wurde eine 50%ige Protein A/G Sepharose-Lösung (30 µl) verteilt. Nach dem Äquilibrieren der Beads mit 500 µl Bohmann/Weiss-Lysepuffer (2000 rpm/ 4°C/ 1 min), wurden 500 µg-1 mg Proteinlysate (Bohmann/Weiss-Lyse) zugegeben und mit Lysepuffer auf 900 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für mindestens 2 h bei 4°C rotiert. Dieses Vorreinigen (*Preclearing*) der Lysate sollte unspezifische Bindungen an die Beads absättigen. Parallel dazu wurden Proben zur Kopplung des Antikörpers an die Beads vorbereitet. Dafür wurden ebenfalls 30 µl der Protein A/G Sepharose-Lösung pro Probe verteilt, in Lysepuffer äquilibriert und mit 900 µl Lysepuffer aufgefüllt. Hier erfolgte nun die Zugabe des spezifischen Antikörpers (2 µg) bzw. der IgGs (2 µg; Kaninchen bzw. Maus). Diese Proben wurden ebenfalls für mindestens 2 h bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper-gekoppelten Beads einmal mit 500 µl Lysepuffer gewaschen und das gereinigte Lysat zugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C auf dem Rotierer. Die Beads wurden dreimal mit 900 µl Bohmann/Weiss-Waschpuffer gewaschen und zwischen den Waschschritten für 3 min bei 4°C rotiert. Dann wurden die pelletierten Beads in 30 µl 2x Roti-

Load für 10 min bei 95°C aufgekocht. Die ko-/immunopräzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

4.4.6 „Half-Way“ ChIP

Zusätzlich zur Ko-Immunopräzipitation wurde ein abgewandeltes ChIP-Protokoll („Half-Way“ ChIP) verwendet, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei wurde kein Ganzzelllysat (Bohmann/Weiss-Lysat) verwendet, sondern ein Chromatin-Lysat. Dadurch sollten Interaktionspartner von Chromatin-assoziierten Proteinen nachgewiesen werden [176].

Die Durchführung entsprach der Beschreibung des ChIP Protokolls unter 4.3.8, wobei ein abgewandeltes Waschprotokoll verwendet wurde. Die Proben wurden nur zweimal in Niedrigsalzpuffer und einmal in Hochsalzpuffer gewaschen. Die pelletierten Beads wurden anschließend in 30 µl 2x Roti-Load für 10 min bei 95°C aufgekocht. Parallel wurden 10% des Inputs in 1x Roti-Load denaturiert. Die Analyse der ko-/immunopräzipitierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot.

4.4.7 Säureextraktion von Histonen

Um die globale Acetylierung von Histonen im Westernblot zu analysieren, wurde eine Säureextraktion von Histonen durchgeführt. Dazu wurden KB-Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät und für 24 h mit TSA (Trichostatin A) behandelt [100, 200, 300 und 400 ng/ml] bzw. unbehandelt gelassen oder mit der entsprechenden Lösungsmittelmenge (Ethanol) behandelt. Nach dem Ernten wurden die Zellen in 600 µl Triton-Extraktionspuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (6500 xg/ 10 min/ 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet, welches nun die Zellkerne enthielt, wurde in 300 µl Triton-Extraktionspuffer gewaschen (6500 xg/ 10 min/ 4°C) und anschließend in 100 µl 0,2 N HCl resuspendiert. Anschließend wurden die Histone über Nacht bei 4°C extrahiert. Nach einer Zentrifugation (6500 xg/ 10 min/ 4°C) konnte der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt werden.

5 Ergebnisse

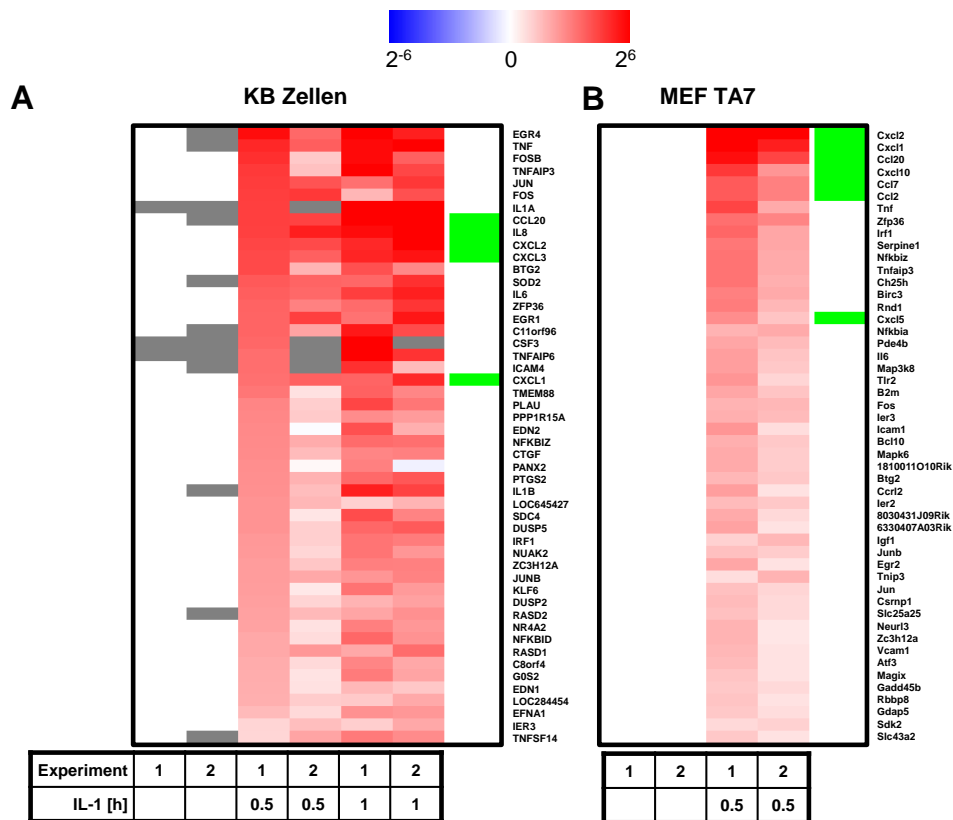
5.1 NF- κ B p65 als Masterregulator von IL-1-induzierbaren Promotoren und Enhancern

Ein initiales Ziel dieser Arbeit war es, im Kontext der Regulation von inflammatorischen Genen den Einfluss der NF- κ B p65 Untereinheit auf die Rekrutierung von weiteren Transkriptionsfaktoren/Ko-Regulatoren und auf Promotor/Enhancer-spezifische Histonmodifikationen zu bestimmen. Hierzu sollte geklärt werden, welcher Faktor initial nach Gabe des Stimulus bindet und essentiell für die weiteren Abläufe zur Aktivierung der Genexpression ist. Zu diesem Zweck wurden p65 „*loss-of-function*“ Ansätze in murinen und humanen Zellsystemen verwendet oder etabliert, welche es erlaubten, die Rolle von p65 am Chromatin genauer zu charakterisieren.

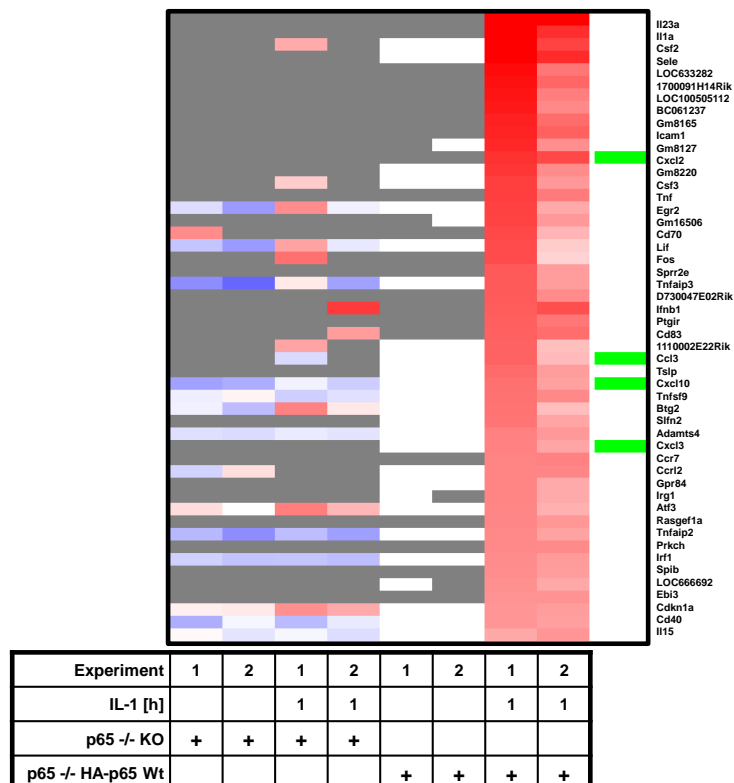
5.1.1 Vergleich der IL-1- und p65-abhängigen Genexpression in humanen und murinen Zellsystemen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wiesen eine starke und reproduzierbare IL-1 Responsivität auf, sodass IL-1-abhängige Effekte auf Ebene von Proteinen, der mRNA und des Chromatins vergleichend untersucht werden konnten. In Abbildung 6 sind Microarray-Analysen der hier verwendeten humanen und murinen Zelllinien dargestellt. Dabei werden bereits existierende (Abb.6A, 6C, 6D), und im Laufe dieser Arbeit generierte (Abb.6B) Analysen miteinander verglichen. Die Sortierung der 50 am stärksten durch IL-1 induzierten Gene macht deutlich, dass in dieser Arbeit untersuchte humane (*IL8*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCL1*, *CCL2*) und murine (*mCxcl2*, *mCxcl1*, *mCcl20*, *mCxcl10*, *mCcl7*, *mCcl2*) Chemokine erst durch den IL-1 Stimulus verstärkt exprimiert werden. Basal (im unstimulierten Zustand) sind sie dagegen häufig kaum messbar (Abb.6). HeLa-Zellen, die im Zellzyklus durch 48 h Serumentzug (Arrest in G0) mit anschließender Serumzugabe für 6 h (Eintritt in die G1-Phase) synchronisiert wurden, zeigten, dass die Induktion vieler dargestellter Gene auch Serum-abhängig sein kann (Abb.6D). Eine zusätzliche Stimulation mit IL-1 verstärkt diese Expression noch weiter (Abb.6D). Außerdem verdeutlichen die Microarray-Analysen von NF- κ B p65-*knockout* murinen embryonalen Fibroblasten (p65 $-/-$ KO MEFs) die zentrale Rolle von p65 für die Expression zahlreicher Zielgene (Abb.6C). Bisher ist jedoch nicht vollständig geklärt, welche Faktoren synergistisch mit NF- κ B für die IL-1-abhängigen Ereignisse an den Promotoren und Enhancern der Zielgene verantwortlich sind, welche Hierarchie der Bindungsereignisse vorliegt und welche Chromatin-Veränderungen stattfinden. Dies sollte im

Folgenden anhand von prototypischen IL-1 Zielgenen mit Hilfe der hier dargestellten Zellsysteme näher charakterisiert werden.



C MEF p65 KO/p65-HA Wt



D

HeLa Zellen

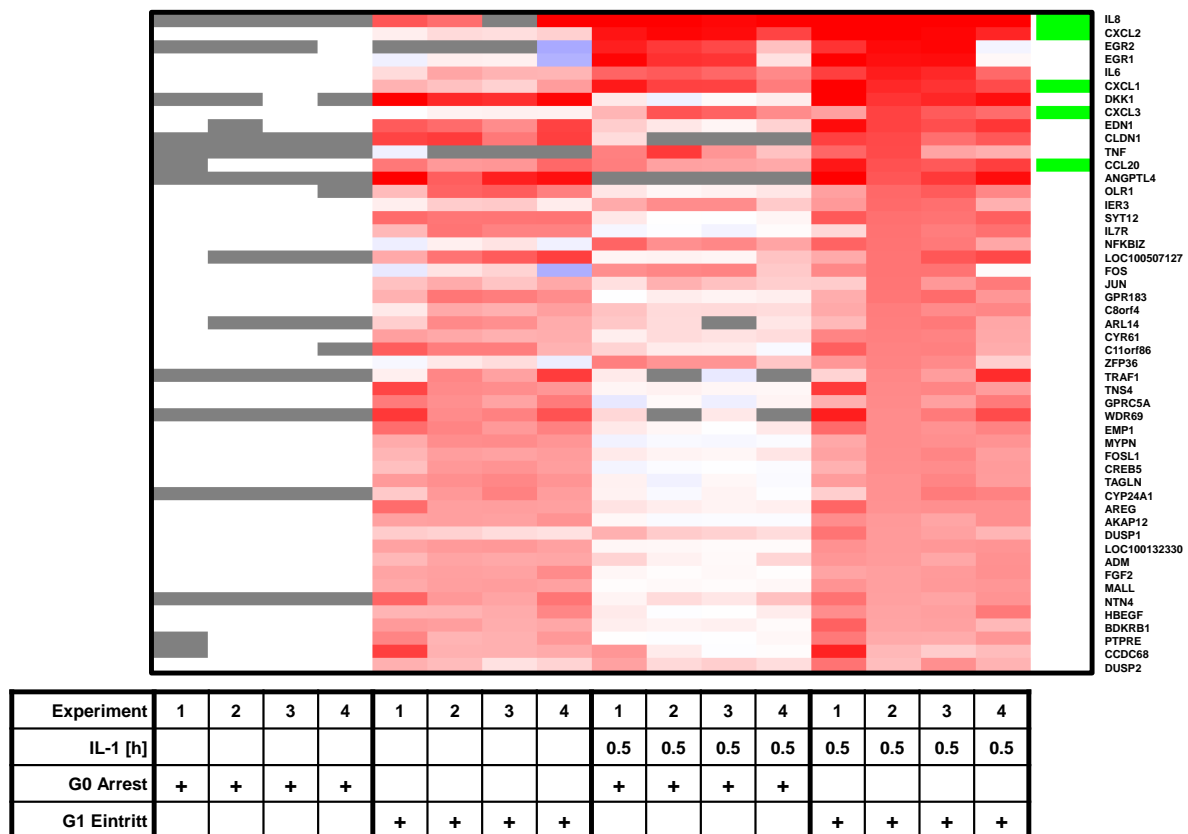


Abbildung 6: Vergleichende Microarray-Analysen von in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen für die 50 am stärksten IL-1-induzierten Gene. Dargestellt sind Microarray-Analysen von IL-1 stimulierten KB-Zellen (A), murinen embryonalen Fibroblasten TA7 (B), NF- κ B p65-defizienten (p65 $-/-$ KO) bzw. mit HA-p65 rekonstituierten (p65 $-/-$ HA-p65 Wt) murinen embryonalen Fibroblasten (C) und im Zellzyklus synchronisierten HeLa-Zellen (D). Die Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit IL-1 [10 ng/ml] stimuliert. Die isolierte RNA aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten wurde für Agilent Microarray-Analysen (Abschnitt 4.3.5) verwendet. Die Mittelwerte der 50 am stärksten durch IL-1 induzierten mRNAs sind als Log2 Ratio mittels Farbcode (*Heatmap*) in absteigender Reihenfolge dargestellt. Rot markierte Gene werden durch IL-1 verstärkt exprimiert, blaue dagegen vermindert. Eine graue Farbe markiert Gene mit niedrigen oder fehlenden Hybridisierungssignalen. Chemokin-Gene werden grün hervorgehoben. Die Daten wurden aus in der Arbeitsgruppe Kracht bestehenden (A modifiziert nach [177], C modifiziert nach [92], D modifiziert nach [100]) und der in dieser Arbeit durchgeführten (B modifiziert nach [92]) Microarray-Analysen von Dr. Axel Weber ausgewertet und mittels MultiExperimentViewer (V.4.8.1 [178]) dargestellt.

5.1.2 Analyse der Rekrutierung von Ko-Faktoren an die *IL8* und *CXCL2* Loci im humanen p65 „*loss-of-function*“-Modellsystem

Im Folgenden wurde in HeLa Zellen ein shRNA-vermittelter p65-*knockdown* etabliert. Eine für die shRNA-kodierende cDNA wurde im Zuge dieser Arbeit in einen pSuper.puro Vektor kloniert. Transient transfizierte Zellen wurden für 48 h mit Puromycin selektiert, um eine starke Defizienz zu gewährleisten. pSuper.puro Transfektionen ohne shRNA *Insert*

(Leervektorkontrollen) dienten hierbei als Kontrollen. In jedem dieser Experimente wurde die verbleibende p65 mRNA- und Proteinmenge mittels RT-qPCRs und Westernblots quantifiziert (Abb.8C, 8D). Die funktionellen Auswirkungen der p65-Defizienz wurden auf Ebene des Chromatins mittels Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP), der mRNA Expression mittels RT-qPCR und der Proteinexpression mittels Westernblot im Vergleich zu den Leervektorkontrollen analysiert (Abb.8). Als klassische IL-1 Zielgene wurden vor allem *IL8* und *CXCL2*, welche den CXC-Chemokincluster auf Chromosom 4 flankieren, näher charakterisiert. In Abbildung 7 sind die Bezeichnungen und die anhand von ChIP-seq Daten aus einem ebenfalls in der Arbeitsgruppe verwendeten humanen Epithelzellmodellsystem, den KB Zellen, ausgewählten Lokalisationen der PCR-amplifizierten Regionen maßstabsgetreu dargestellt. Diese Primerpaare für die *IL8* und *CXCL2* Loci wurden in den nachfolgend beschriebenen ChIPs verwendet. Es wurden sowohl die Promotoren als auch die Enhancer, welche strangaufwärts der Promotoren liegen, untersucht. Die p65-bindenden Enhancer wurden mittels genomweiter Auswertungen als Klasse II-Enhancer definiert und zeichnen sich durch eine IL-1-stimulierbare Acetylierung von H3K27 und eine IL-1-unabhängige Monomethylierung von H3K4 aus [177]. Als Negativkontrollen dienten genfreie Regionen zwischen Enhancern und Promotoren. Sowohl Enhancer als auch Promotoren weisen unter den experimentell ermittelten regulierten p65 ChIP-seq Peaks NF- κ B Motive auf und zeichnen sich durch eine IL-1-induzierte p65 Bindung, sowie Promotor- und Enhancer-spezifische Histonmodifikationen (H3K27ac und H3K4me1) aus (Abb.7).

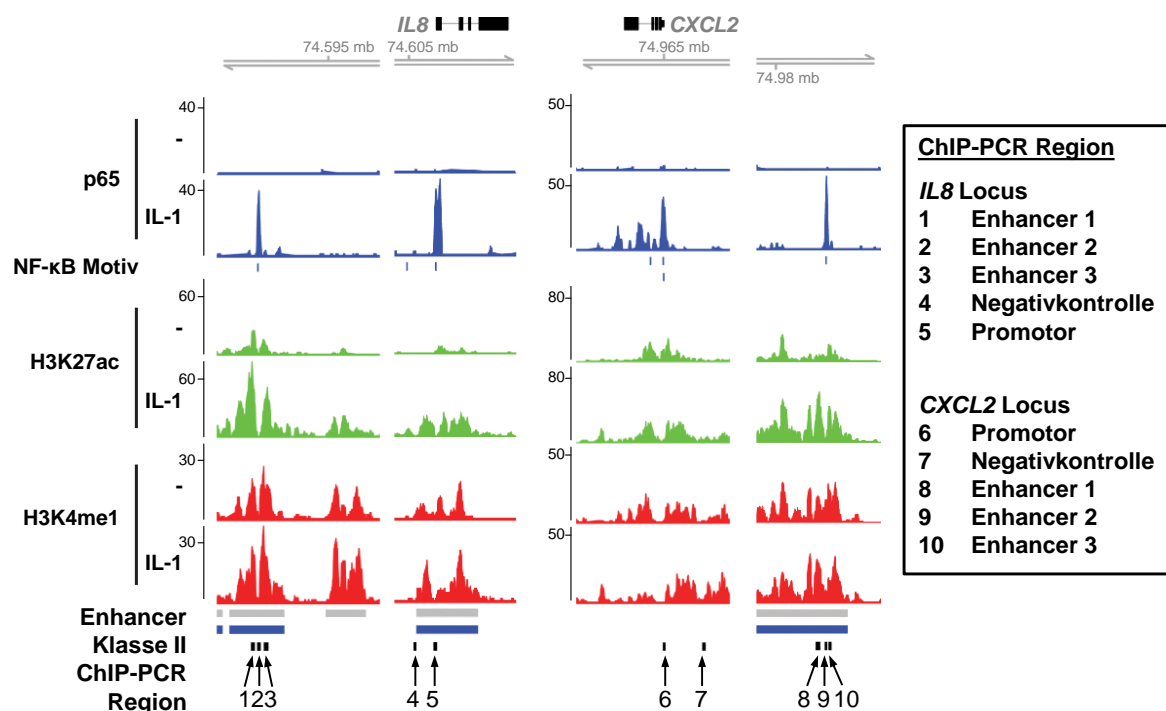
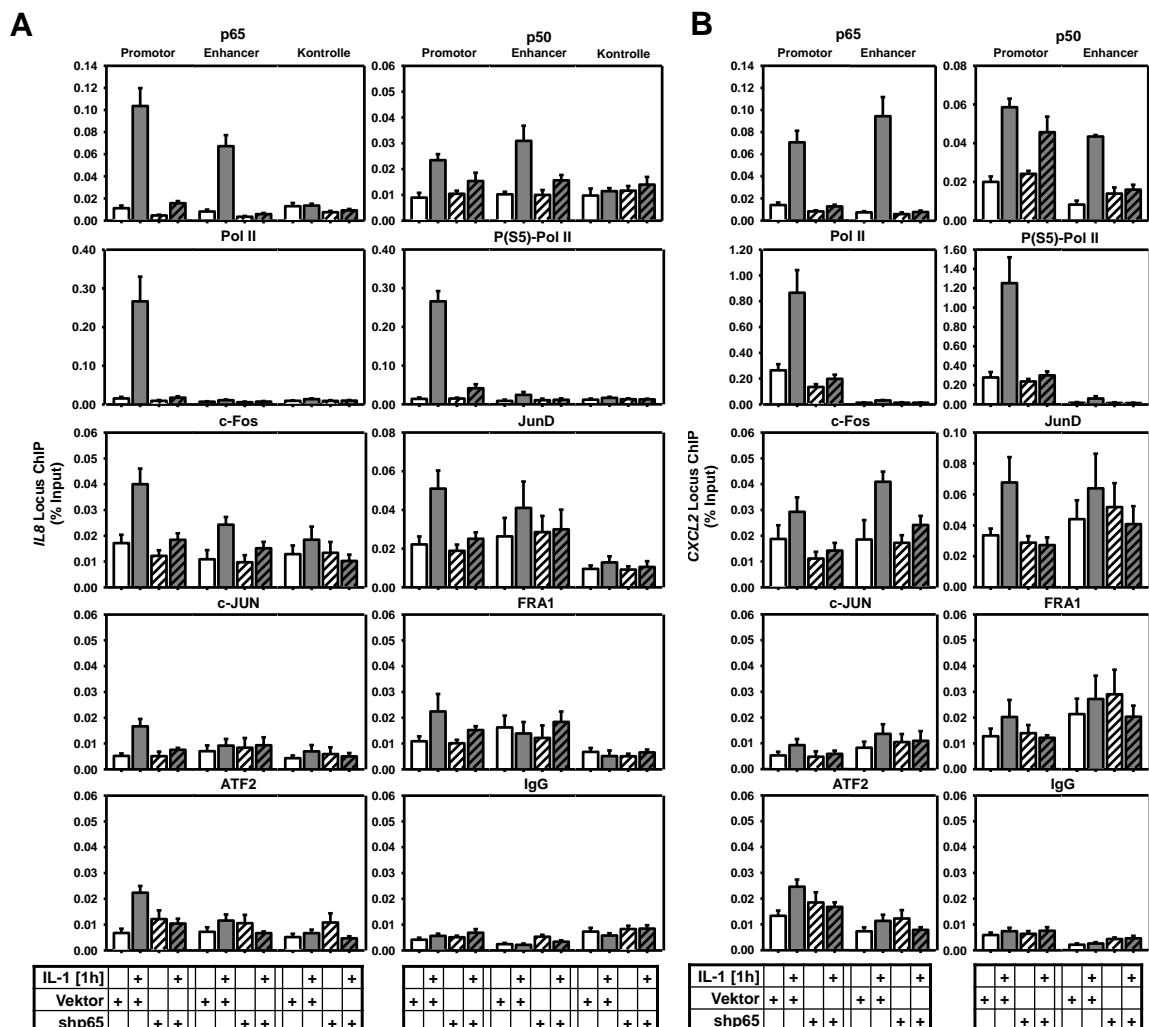


Abbildung 7: Lokalisation der ChIP-PCR Regionen an den humanen *IL8* und *CXCL2* Loci. Dargestellt sind Ausschnitte von ChIP-seq Profilen aus KB Zellen für die angegebenen Antikörper und Stimulationsbehandlungen mit IL-1 α [10 ng/ml / 1 h] an den *IL8* und *CXCL2* Loci auf Chromosom 4. Markiert sind Regionen mit einem NF- κ B Motiv, Klasse II Enhancern und die mittels PCR

amplifizierten DNA-Abschnitte. Die Experimente wurden von Liane Jurida durchgeführt. (Abbildung modifiziert nach [177])

Um die IL-1-induzierte Bindung von Ko-Faktoren in p65-defizienten HeLa Zellen an den *IL8* und *CXCL2*-Loci zu untersuchen, wurden ChIP Experimente durchgeführt (Abb.8A, B). Am *IL8* Promotor wurde eine IL-1-induzierte Rekrutierung von p65, p50, RNA-Pol II, P(S5)-Pol II, c-Fos, JunD, c-JUN, FRA1 und ATF2 gefunden. Am *CXCL2* Promotor lag dagegen die Detektion von c-JUN im Bereich der Negativkontrolle. In den p65-*knockdown* Proben waren diese Bindungen gehemmt oder stark reduziert. Am *IL8* und *CXCL2* Enhancer konnte eine signifikante IL-1-abhängige Bindung von p65, p50, c-Fos und JunD nachgewiesen werden. Die Signale für c-JUN und ATF2 lagen im Bereich der Negativkontrolle, während FRA1 eine IL-1-unabhängige Bindung über den Negativkontrollen aufwies. Der p65 Verlust führte auch hier zu verminderten Signalen aller IL-1-induzierten Bindungen. JunD zeigte an beiden Promotoren und Enhancern bereits eine basale Bindung, die durch IL-1 jedoch gesteigert wurde. Im p65-*knockdown* sank die JunD Bindung wieder auf ihr basales Niveau zurück, wurde aber nicht weiter reduziert (Abb.8A, B).



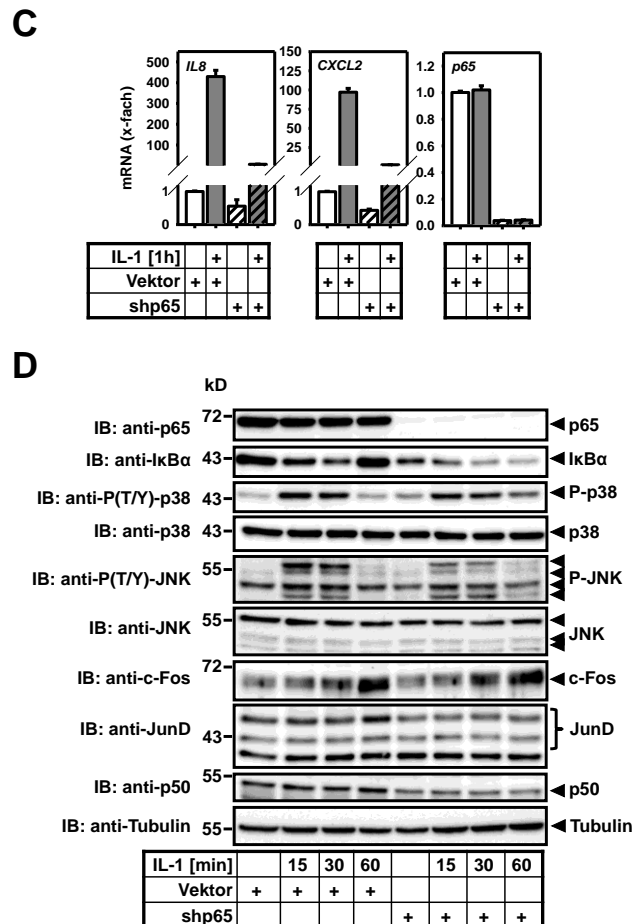


Abbildung 8: NF- κ B p65 spielt eine essentielle Rolle für die Rekrutierung von Ko-Faktoren an die *IL8* und *CXCL2* Loci und für die *IL8* und *CXCL2* mRNA Expression. HeLa Zellen wurden mit pSuper.puro Kontrollvektor bzw. pSuper.puro-shp65 transfiziert, für 48 h mit 1 μ g/ml Puromycin selektiert und mit IL-1 α [10 ng/ml] für 1 h stimuliert bzw. nicht behandelt. Die ChIP wurde mit den beschriebenen Antikörpern durchgeführt und mittels Real-Time PCR und den angegebenen Primerpaaren für die Promotoren, Enhancer und genfreien Kontrollregionen an den *IL8* und *CXCL2* Loci analysiert (Abb.7). IgG-IPs wurden als Negativkontrolle verwendet. Für die jeweiligen Antikörper sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus mindestens zwei, maximal vierzehn unabhängigen Experimenten gezeigt (A)(B). Die *p65*-, *IL8*- und *CXCL2*-Expression wurden mittels RT-qPCR untersucht und die Mittelwerte \pm s.e.m. aus sieben unabhängigen Experimenten dargestellt (C). Für die Analyse der Proteinmengen im Westernblot wurde eine IL-1 Zeitreihe mit den angegebenen Zeitpunkten durchgeführt und die Expression der IL-1 Signalwegkomponenten p65, I κ B α , P-p38, p38, P-JNK, JNK, c-Fos, JunD und p50 überprüft (in Kooperation mit Helmut Müller) (D). (Abbildung modifiziert nach [177])

Die p65-Defizienz wirkte sich auch auf die Expression der Zielgene *IL8* und *CXCL2* aus. Hier sank der induzierbare mRNA-Spiegel fast komplett ab (Abb.8C). Auch der basale *IL8* und *CXCL2* mRNA Spiegel war erniedrigt (Abb.8C).

Um die Auswirkungen des p65-*knockdowns* auf wesentliche Komponenten des IL-1 Signalwegs zu überprüfen, wurden Westernblot Analysen nach einer IL-1 Zeitreihe durchgeführt (Abb.8D). Die Expression der p65 Zielgene I κ B α und p50 wurde im p65-

knockdown wie erwartet gehemmt, wodurch vor allem die Resynthese des zytosolischen NF- κ B Inhibitors I κ B α stark beeinträchtigt wurde. Ein p65-*knockdown* hatte erwartungsgemäß daher auch massive Effekte auf seine proximal gelegenen Regulatoren. Dagegen waren die Phosphorylierungen von p38 und JNK, sowie deren totalen Proteinmengen, deutlich weniger und die Proteinmengen von c-Fos und JunD nicht beeinflusst. Folglich sind die in Abbildung 8A gezeigten Chromatineffekte des p65-*knockdowns* am ehesten auf die Rekrutierung der beschriebenen Faktoren und nicht auf eine global verminderte Expression oder Regulation zurückzuführen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass p65 einen zentralen und essentiellen molekularen Schalter der IL-1-abhängigen Genexpression darstellt, der eine Vielzahl weiterer Bindungsereignisse am Chromatin kontrolliert.

5.1.3 Einfluss von NF- κ B p65 auf den Histonstatus von IL-1-induzierbaren Promotoren und Enhancern

Wie Liane Jurida im Laufe ihrer Dissertation in KB Zellen bereits zeigen konnte, wird die Acetylierung von H3K27 an IL-1-abhängigen Promotoren und Enhancern durch den IL-1 Stimulus weiter gesteigert, während die Monomethylierung von H3K4 an diesen Loci unverändert bleibt [177]. Durch die Verwendung des zuvor dargestellten p65 „*loss-of-function*“ Modellsystems, sowie durch pharmakologische Hemmung von IKK2 bzw. *knockdown* von TAK1, sollte im Folgenden der Signalweg, welcher zur IL-1-regulierten H3K27ac führt, näher untersucht werden.

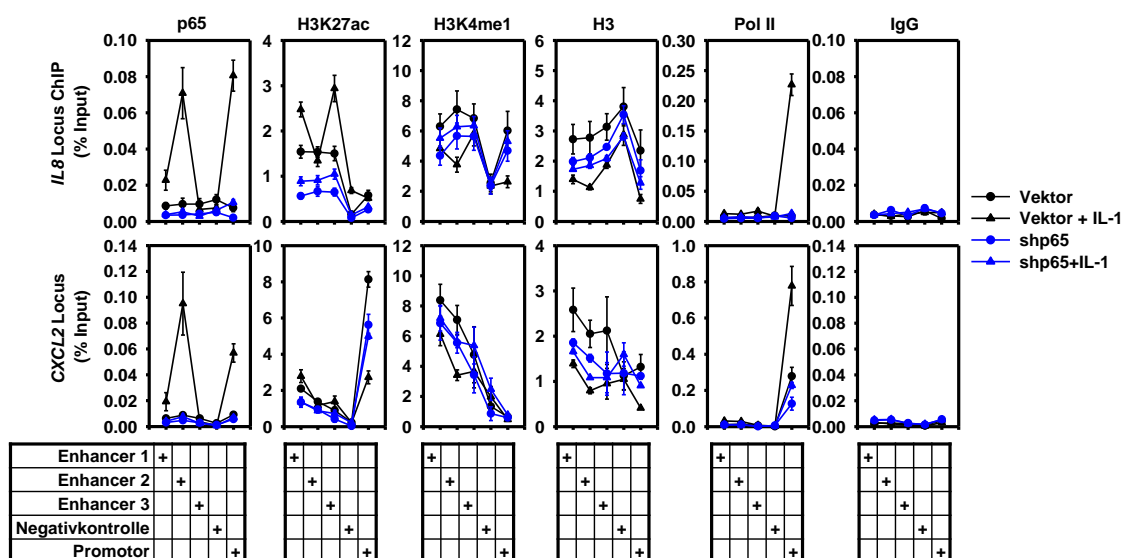
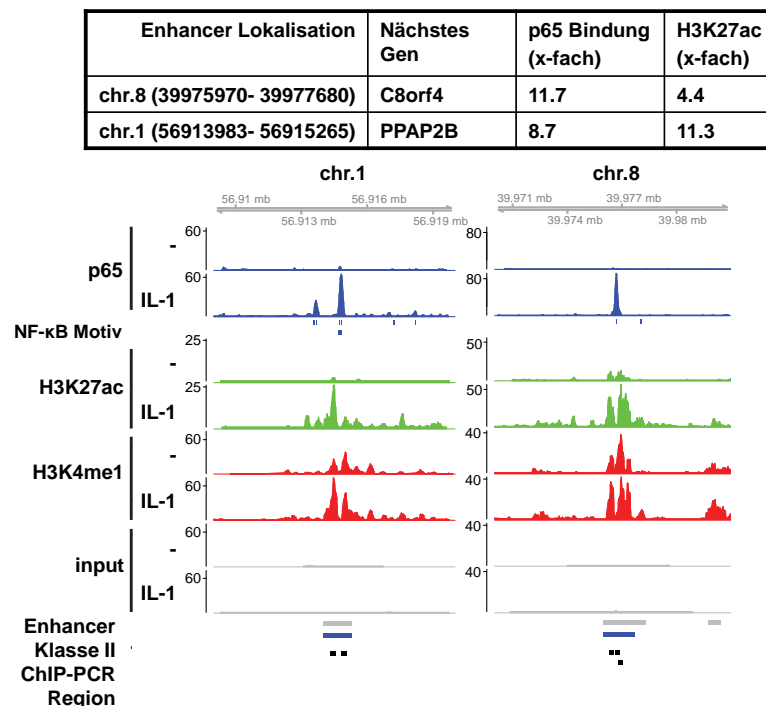


Abbildung 9: Essentielle Rolle von p65 für die IL-1-abhängige Acetylierung von H3K27 an den IL8 und CXCL2 Loci. HeLa Zellen wurden mit pSuper.puro Kontrollvektor bzw. pSuper.puro-shp65 transfiziert, für 48 h mit 1 μ g/ml Puromycin selektiert und mit IL-1 α [10 ng/ml] für 1 h stimuliert bzw. nicht behandelt. Die ChIP wurde mit den beschriebenen Antikörpern durchgeführt und mittels Real-

Time PCR und den aufgeführten Primerpaaren für die *IL8* und *CXCL2* Loci (in Abb.7 dargestellt) analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. (Abbildung modifiziert nach [177])

Es wurden ChIP Experimente in p65-defizienten HeLa Zellen mit IL-1 Stimulation durchgeführt und die Auswirkungen des *knockdowns* auf die Acetylierung von H3K27 und die Monomethylierung von H3K4 an den *IL8* und *CXCL2* Loci analysiert (Abb.9). In den Vektorkontroll-Zellen nahm nach IL-1 Stimulation die Histondichte (H3) ab, sodass der Locus offenbar zugänglicher für Transkriptionsfaktoren und Ko-Faktoren wurde. Außerdem stiegen nach IL-1 Behandlung die Signale für H3K27ac vor allem am *IL8* Enhancer an. Die H3K4 Monomethylierung war relativ zur H3 Dichte durch IL-1 dagegen kaum beeinflusst. In den p65-*knockdown* Zellen war die Abnahme der Histondichte und somit die weitere Öffnung des Chromatinlocus vermindert. Gleichzeitig wurde die IL-1-induzierte H3K27 Acetylierung stark reduziert, während H3K4me1 relativ zur Histondichte kaum Veränderungen zeigte. Die relativen Änderungen sind in Abb.15 noch einmal zusammenfassend mit weiteren *knockdown*-Experimenten graphisch dargestellt. Die beobachteten Effekte auf die IL-1-abhängigen Enhancer von *IL8* und *CXCL2* wurden zusätzlich an zwei weiteren als Klasse II Enhancer definierten Loci untersucht (Abb.10). Diese beiden Enhancer-Strukturen lagen in der Nähe von *C8orf4* (Chromosom 8) bzw. *PPAP2B* (Chromosom 1) und wiesen ebenfalls eine IL-1-induzierte p65 Bindung (11.7 bzw. 8.7-fach) und H3K27 Acetylierung (4.4 bzw. 11.3-fach) auf (Abb.10A).

A



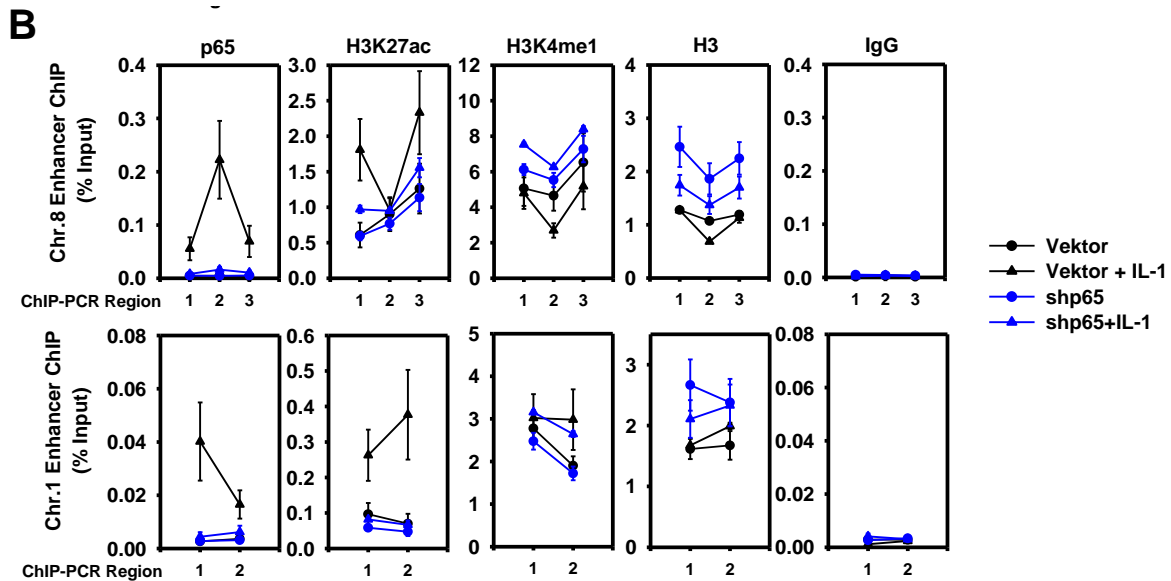


Abbildung 10: Charakterisierung von zwei zusätzlichen p65-abhängigen intergenischen Enhancern. Die oben dargestellte Tabelle enthält Informationen zur genomischen Lokalisation und Regulation von zwei zusätzlichen Klasse II Enhancern auf Chromosom 1 und 8. Darunter sind Ausschnitte für diese Chromosomenabschnitte von ChIP-seq Profilen aus KB Zellen für p65, H3K27ac, H3K4me1 und die Inputkontrolle gezeigt. Dabei werden unbehandelte und IL-1 α -stimulierte Proben [10 ng/ml/ 1 h] verglichen. Zusätzlich sind Regionen mit vorhergesagten NF- κ B Motiven, Enhancern/Klasse II Enhancern und die mittels PCR amplifizierten DNA-Abschnitte markiert (A). HeLa p65-*knockdown* Zellen wurden, wie in Abb. 9 beschrieben, behandelt und die IL-1-induzierte p65 Bindung, H3 Modifikationen und die H3 Beladung mittels ChIP untersucht. IgG-IPs dienten als Negativkontrolle. Für die jeweiligen Antikörper sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt (B). (Abbildung modifiziert nach [177])

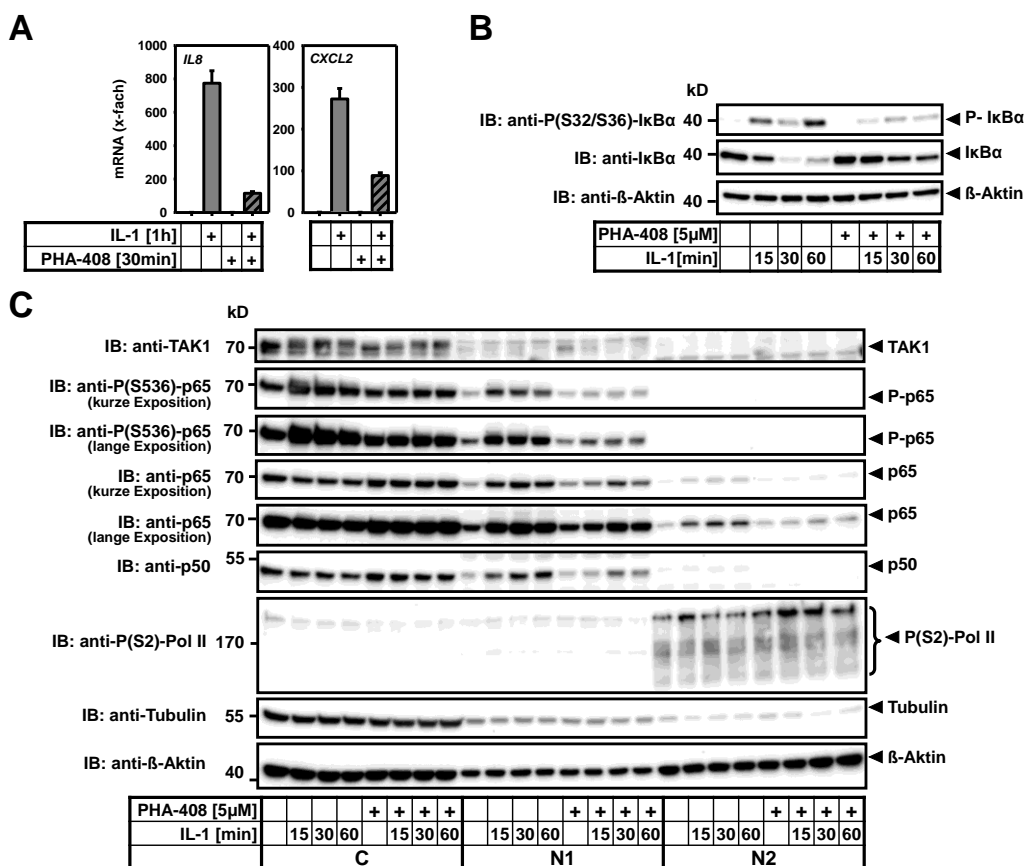
Die Effekte in p65-defizienten HeLa Zellen konnten in ChIP Experimenten an beiden *Loci* bestätigt werden: Die p65 Rekrutierung und die H3K27 Acetylierung wurden im p65-*knockdown* gehemmt, während die H3K4 Monomethylierung weitgehend unbeeinflusst blieb (Abb.10B).

5.1.4 Charakterisierung der apikalen Signalwege der NF- κ B p65-abhängigen Effekte an IL-1-induzierbaren Promotoren und Enhancern

Liane Jurida konnte in ihrer Dissertation bereits zeigen, dass die zytosolische Kinase TAK1 eine essentielle Rolle für die IL-1-induzierte p65 Bindung und H3K27 Acetylierung an den Klasse II Enhancern spielt [177]. Um den vorgeschalteten Signalweg weiter einzugrenzen, der an der Gen- und Enhancer-spezifischen Rekrutierung von NF- κ B p65 beteiligt ist, wurde die TAK1-abhängige Kinase IKK2 spezifisch durch den reversiblen ATP-kompetitiven Inhibitor PHA-408 [179] gehemmt. Die Inhibition von IKK2 verhindert die Stimulus-induzierte

Phosphorylierung und den proteasomalen Abbau von I κ B α . p65 wird dadurch im Zytosol zurückgehalten und die Translokation in den Zellkern ist gehemmt.

Zunächst wurde die Funktionalität von PHA-408 mittels Westernblot und RT-qPCR in KB Zellen überprüft (Abb.11A-D). In einer zuvor getesteten Dosis-Wirkungskurve von PHA-408 (Daten nicht gezeigt) und mit einer dadurch ermittelten relativ niedrigen Konzentration des Inhibitors (5 μ M) in einer IL-1 Zeitreihe, konnte die Hemmung der I κ B α Phosphorylierung und damit der reduzierte Abbau von I κ B α im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb.11B). Durch eine fraktionierte Lyse wurde die Lokalisation der *upstream* gelegenen Proteinkinase TAK1, sowie des *downstream* gelegenen p65 Proteins nach unterschiedlichen IL-1 Zeitpunkten im Zytosol und der löslichen bzw. unlöslichen Kernfraktion untersucht (Abb.11C). Während die Expression und Lokalisation von TAK1 wie erwartet nicht vom Inhibitor beeinflusst wurde, war die Translokation von p65 und p50 nach IL-1 Stimulation gehemmt. p65 zeigte außerdem eine reduzierte Phosphorylierung an S536, welche mit publizierten Ergebnissen übereinstimmt [94, 98]. Man erkennt dabei, dass sich der überwiegende Anteil von p65 in der löslichen Kernfraktion befindet und zu einem gegebenen Zeitpunkt nur ein kleiner Anteil stabil mit dem Chromatin assoziiert ist. Die Menge an p65 in beiden Fraktionen ist IL-1 stimulierbar (Abb.11C).



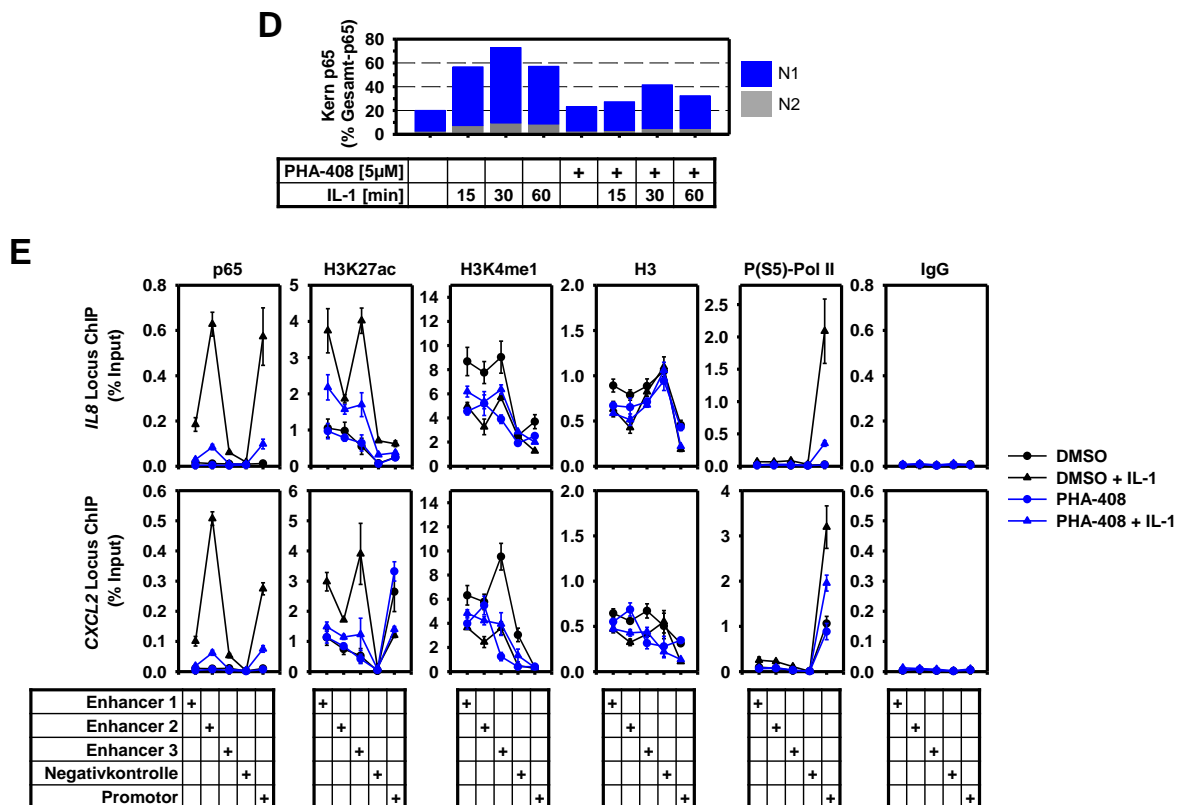


Abbildung 11: Die Hemmung von IKK2 beeinflusst die nukleäre Lokalisation von p65 und die IL-1-induzierte H3K27 Acetylierung und Chemokinexpression. KB Zellen wurden mit dem IKK2 Inhibitor PHA-408 [5 µM/ 30 min] in Kombination mit IL-1α [10 ng/ml] für die angegebenen Zeitpunkte behandelt oder mit DMSO [0,005%] inkubiert (**A-E**). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde mittels RT-qPCR quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte als x-fache Regulation \pm s.e.m. aus drei unabhängigen Experimenten (**A**). Die suppressiven Effekte von PHA-408 auf den IκBα Abbau wurden mittels Immunoblot aus Ganzzelextrakten mit den angegebenen Antikörpern überprüft. β-Aktin diente dabei als Ladungskontrolle (in Kooperation mit Helmut Müller) (**B**). Es wurden die zytosolische (C), lösliche (N1) und unlösliche (N2) Kernfraktionen präpariert und auf die Präsenz von TAK1, P-p65, p65 und p50 NF-κB untersucht. β-Aktin, Tubulin und P(S2)-Pol II dienten als Ladungs- bzw. Reinheitskontrolle für jede zelluläre Fraktion (in Kooperation mit Helmut Müller) (**C**). Die Daten aus (C) wurden quantifiziert und die relative Menge an p65 in N1 und N2 im Vergleich zur Gesamtproteinmenge in unstimulierten Zellen, welche als Summe der Signale der Proteinbanden in C+N1+N2 ermittelt wurde, graphisch dargestellt (**D**). In ChIP Experimenten wurden die PHA-408-behandelten KB Zellen mit den angegebenen Antikörpern und Primerpaaren für die *IL8* und *CXCL2* Loci mittels Real-Time PCR analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (**E**). (Abbildung modifiziert nach [177])

Die ECL Signale der p65 Proteinbanden in N1 (lösliche Kernfraktion) und N2 (Chromatinfraction) wurden quantifiziert, wodurch eine ca. 60%ige Abnahme von p65 in N2 verdeutlicht wird (Abb.11D). Die verminderte Translokation von p65 führte in Übereinstimmung mit den p65-knockdown Ergebnissen auch zu einer reduzierten mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* (Abb.11A). In ChIP Experimenten wurden anschließend die Effekte des IKK2-Inhibitors auf Ebene des Chromatins analysiert (Abb.11E). Während die p65 Bindung an allen untersuchten Loci stark vermindert war und die P(S5)-Pol II am

Promotor reduziert vorlag, wurde die IL-1-induzierte H3K27 Acetylierung ebenfalls gehemmt. Auch hier war die Monomethylierung von H3K4 durch den Inhibitor kaum beeinflusst (Abb.11E). Die Daten aus Abbildung 11E wurden zusätzlich auf die H3-Dichte normiert und mit Daten aus KB Zellen, die mit dem TAK1-Inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol behandelt wurden, verglichen (Abb.12). Dieser Zell-permeable und ATP-kompetitive Kinase-Inhibitor bindet kovalent an das Cystein an Stelle 174 innerhalb der ATP-Bindetasche von TAK1 und erlaubt eine schnelle Inhibition von TAK1 in kultivierten Zellen [180, 181]. Im Gegensatz zur fast unveränderten Monomethylierung von H3K4, zeigte die IL-1-induzierte Acetylierung von H3K27 bei beiden Inhibitoren des TAK1-IKK2-Signalwegs eine deutliche Reduktion (Abb.12).

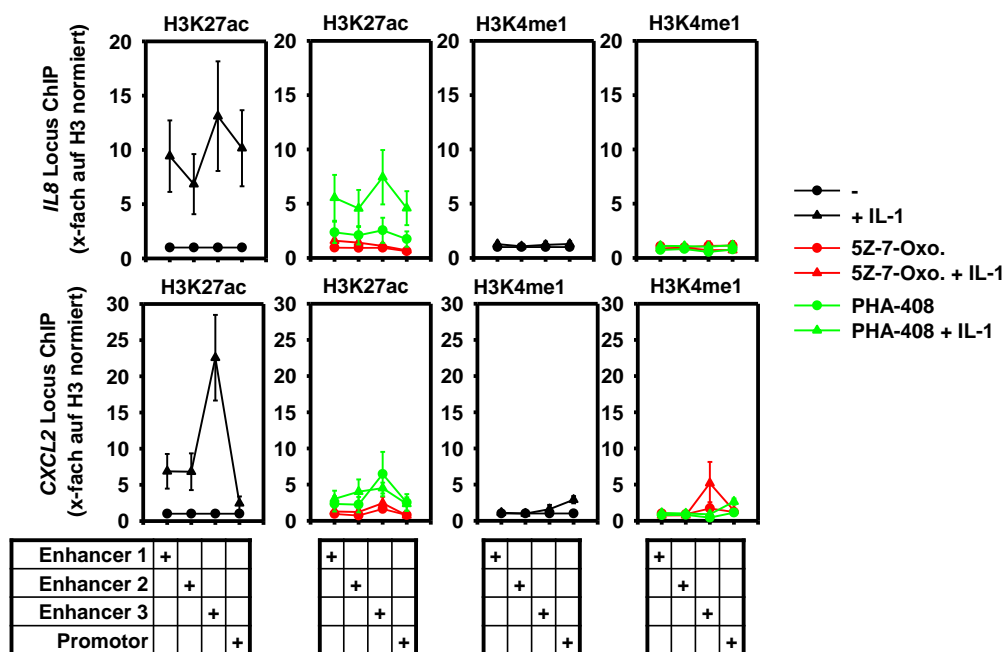


Abbildung 12: Relative Effekte einer pharmakologischen TAK1- bzw. IKK2-Hemmung auf die IL-1-abhängige H3K27 Acetylierung an den *IL8* und *CXCL2* Loci. Zusammenfassende Darstellung der ChIP Experimente für H3, H3K27ac und H3K4me1 aus Abbildung 11E (für PHA-408) mit analog erhobenen Daten aus KB Zellen, die mit 5Z-7-Oxozeaenol [1 μ M/ 30 min] vorbehandelt wurden. Die Messungen für H3K27ac und H3K4me1 wurden dabei zusätzlich auf die H3 Dichte normiert und die unbehandelten Proben jeweils gleich eins gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. von vier (Vektorkontrollen) bzw. zwei (5Z-7-Oxozeaenol, PHA-408) unabhängigen Experimenten. (Abbildung modifiziert nach [177])

Eine Bestätigung der durch den TAK1-Inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol beobachteten Effekte konnte durch einen TAK1-*knockdown* erzielt werden (Abb.13). Hierzu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Katja Handschick fünf verschiedene shTAK1 Konstrukte getestet und die Transfektions-/Selektionsbedingungen optimiert (Daten nicht gezeigt). Ein transients *knockdown* von TAK1 mit dem wirksamsten shRNA Konstrukt führte sowohl zu einer deutlichen Reduktion der TAK1 Proteinmenge (Abb. 13B), als auch zu einer deutlich reduzierten mRNA Expression der IL-1-induzierbaren *IL8* und *CXCL2* mRNA Expression

(Abb.13A). In ChIP Experimenten konnte eine verminderte Bindung von p65 und P(S5)-Pol II an allen Loci beobachtet werden, sowie eine Reduktion der IL-1-induzierten H3K27ac (Abb.13C).

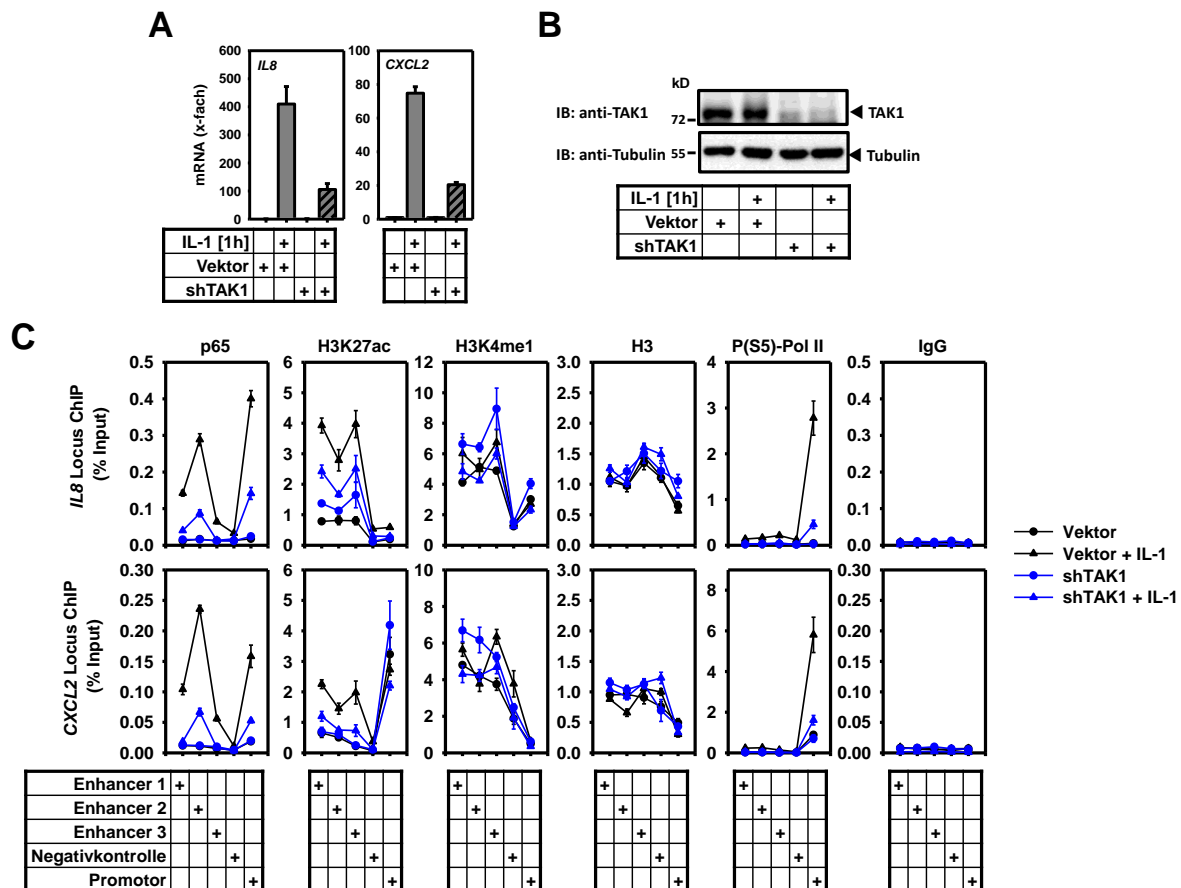


Abbildung 13: Einfluss einer Suppression der TAK1 Proteinmenge auf die IL-1-abhängige Acetylierung von H3K27 und die Genexpression an den *IL8* und *CXCL2* Loci. HeLa Zellen wurden mit pSuper.puro Kontrollvektor bzw. pSuper.puro-shTAK1 transfiziert, für 48 h mit 1 µg/ml Puromycin selektiert und mit IL-1α [10 ng/ml] für 1 h stimuliert bzw. nicht behandelt (**A-C**). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde mittels RT-qPCR quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte als x-fache Regulation \pm s.e.m. aus fünf unabhängigen Experimenten (**A**). Mit Hilfe eines Immunoblots wurde die Protein Expression von TAK1 überprüft. Tubulin diente als Ladungskontrolle (**B**). Die ChIP wurde mit den beschriebenen Antikörpern durchgeführt und mittels Real-Time PCR und den angegebenen Primerpaaren für die *IL8* und *CXCL2* Loci (in Abbildung 7 dargestellt) analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (**C**). (Abbildung modifiziert nach [177]; in Kooperation mit Dr. Katja Handschick)

5.1.5 Einfluss von c-Fos und JunD auf die IL-1-abhängigen Rekrutierungsereignisse und Enhancer-Formierungen am CXC-Cluster

Die vorhergehenden Experimente zeigten, dass NF- κ B p65 eine zentrale Rolle in der Rekrutierung von weiteren Faktoren und der IL-1-induzierten H3K27ac an den untersuchten Loci einnimmt. Um den reziproken Fall zu untersuchen, d.h. ob Faktoren für die Rekrutierung

von p65 benötigt werden, wurde die Expression zweier ausgewählter AP-1 Faktoren (c-Fos und JunD) über RNAi-Experimente reduziert und die p65 Rekrutierung in ChIPs analysiert (Abb.14). c-Fos diente als Beispiel für ein Protein, dessen zelluläre Expression von IL-1 induziert wird und welches nur transient nach IL-1 Stimulation an den Enhancern und Promotoren von *IL8* und *CXCL2* bindet. Dagegen zeigt JunD bereits eine konstitutive Chromatinbindung, die durch IL-1 noch weiter gesteigert wird, während die zelluläre Gesamtproteinmenge durch IL-1 nicht reguliert wird. Beide Bindungen sind jedoch von p65 abhängig (Abb.14). Ein transients *knockdown* von c-Fos und JunD führte zu einer deutlichen Reduktion der Proteinmenge (Abb.14B). Zu dem gewählten Stimulationszeitpunkt (1 h IL-1 α) wurden nur mäßige Veränderungen auf die *IL8* mRNA festgestellt, während die Depletion von c-Fos in einer ca. 50%igen Reduktion der *CXCL2* mRNA resultierte. In ChIP Experimenten (Abb.14C) war ebenfalls der *knockdown* beider Faktoren als verminderte Rekrutierung am Chromatin detektierbar. Die Bindung von p65 und P(S5)-Pol II war in den depletierten Zellen nur wenig beeinflusst, während die H3K27 Acetylierung nach IL-1 sogar leicht anstieg. Dagegen waren die H3-Dichte und H3K4 Monomethylierung kaum verändert.

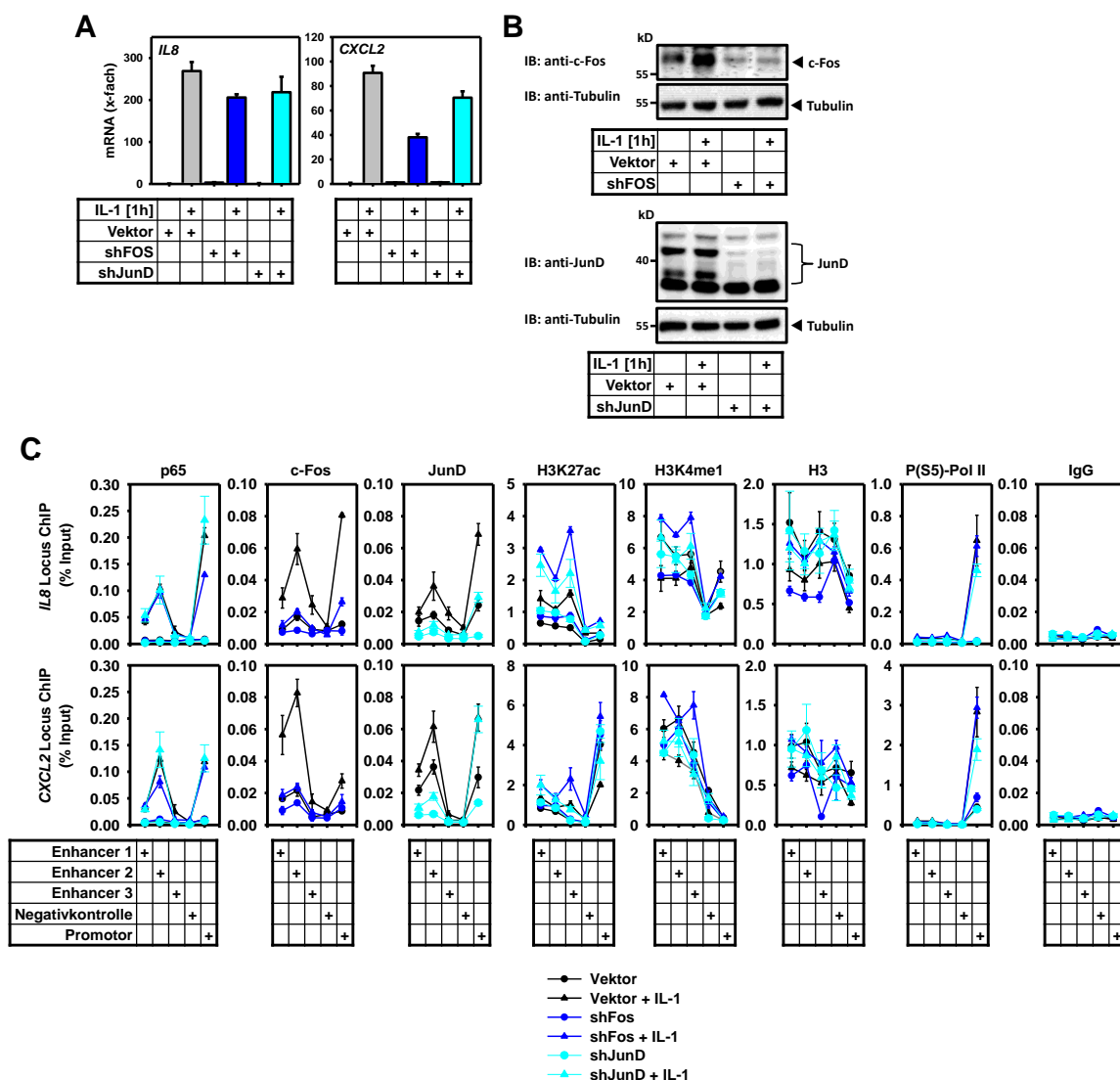


Abbildung 14: c-Fos und JunD haben wenig Einfluss auf die IL-1-abhängigen Effekte an den *IL8* und *CXCL2* Loci. HeLa Zellen wurden mit pSuper.puro Kontrollvektor bzw. pSuper.puro-shFOS oder shJunD transfiziert, für 48-72 h mit 1 µg/ml Puromycin selektiert und mit IL-1α [10 ng/ml] für 1 h stimuliert bzw. nicht behandelt (**A-C**). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde mittels RT-qPCR quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte als x-fache Regulation +/- s.e.m. aus sechs (Vektorkontrollen) bzw. mindestens zwei (shFOS, shJunD) unabhängigen Experimenten (**A**). Mit Hilfe eines Immunoblots wurde die Proteinexpression von c-Fos bzw. JunD überprüft. Tubulin diente als Ladungskontrolle (**B**). Die ChIP wurde mit den aufgeführten Antikörpern durchgeführt und mittels Real-Time PCR und den angegebenen Primerpaaren für die *IL8* und *CXCL2* Loci (in Abbildung 7 dargestellt) analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- s.e.m. [% Input] aus fünf (Vektorkontrollen) bzw. mindestens zwei (shFOS, shJunD) unabhängigen Experimenten (**C**). (Abbildung modifiziert nach [177]; in Kooperation mit Dr. Katja Handschick)

In Abbildung 15 wurden die Daten für H3K27ac und H3K4me1 aus Abbildung 9, 13C und 14C zusätzlich auf die Histondichte (H3) normiert und vergleichend als relative Änderungen dargestellt. Während die Depletion von c-Fos und JunD wenig oder sogar eine induzierende Wirkung auf die IL-1-abhängige H3K27 Acetylierung besaß, zeigten p65- und TAK1-*knockdown* Zellen eine starke Inhibition. Die Monomethylierung an H3K4 war dagegen durch keinen *knockdown* signifikant verändert.

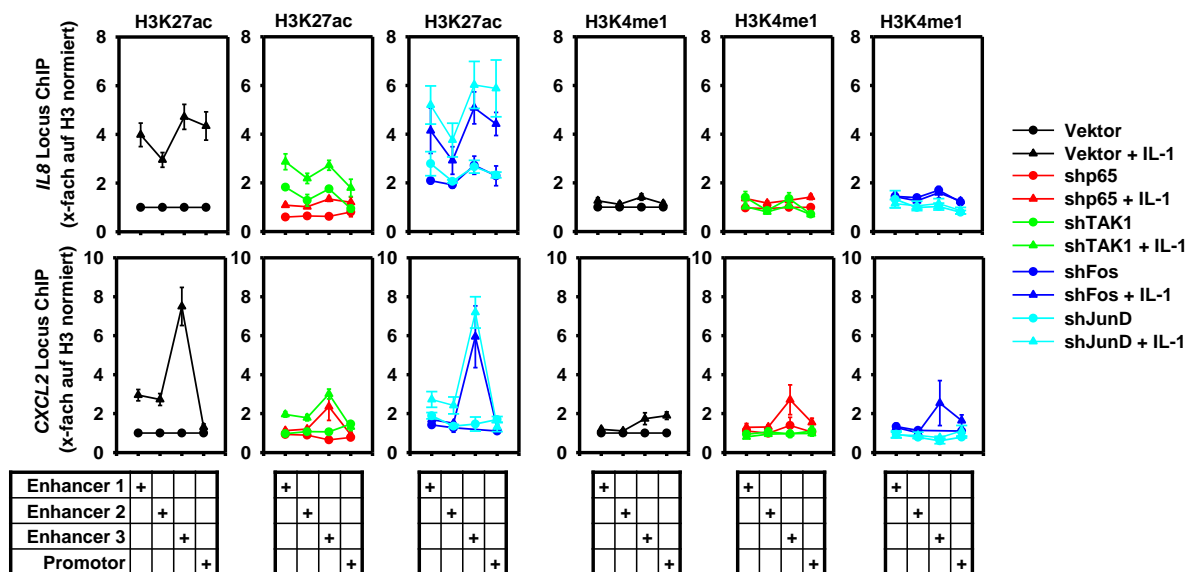


Abbildung 15: TAK1 und NF-κB p65 sind im Gegensatz zu c-Fos und JunD wichtige Komponenten eines IL-1-regulierten Signalweges, der zur H3K27 Acetylierung an den *IL8* und *CXCL2* Loci führt. Die ChIP Experimente für H3, H3K27ac und H3K4me1 aus Abbildung 9, 13C und 14C wurden hier zusammengefasst dargestellt. Die Messwerte für H3K27ac und H3K4me1 wurden dabei zusätzlich auf die H3 Dichte normiert und die unbehandelten Proben jeweils gleich eins gesetzt. Ein Datenpunkt für den *CXCL2* Locus (gezeigt in Abbildung 14C; shFOS; a-H3K4me1) wurde aufgrund von sehr niedrigen H3 Werten, die zu nicht plausiblen falsch positiven Ratios führen, aus der Analyse ausgeschlossen. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- s.e.m. von zehn (Vektorkontrollen), drei (shTAK1, shJunD) bzw. zwei (shp65, shFOS) unabhängigen Experimenten. (Abbildung modifiziert nach [177]; in Kooperation mit Dr. Katja Handschick)

Zusammenfassend zeigen die in Kapitel 5.1 dargestellten Ergebnisse, dass NF- κ B p65 eine zentrale Rolle in der Regulation von Bindungsereignissen und Enhancer-Formierungen am CXC-Chemokincluster nach IL-1 Stimulation einnimmt (Abb.16). Die Ergebnisse weisen eine Hierarchie der Bindungsereignisse auf. p65 fungiert dabei als Masterregulator, denn erst durch die Rekrutierung von p65 werden weitere Faktoren gebunden und die Enhancer-spezifische H3K27 Acetylierung induziert. Durch die Manipulation von Regulatorproteinen im zytosolischen IL-1 Signalweg konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Effekte primär über den TAK1-IKK2-p65 Signalweg reguliert werden, während AP-1 Proteine wie c-Fos und JunD wenig Einfluss besitzen.

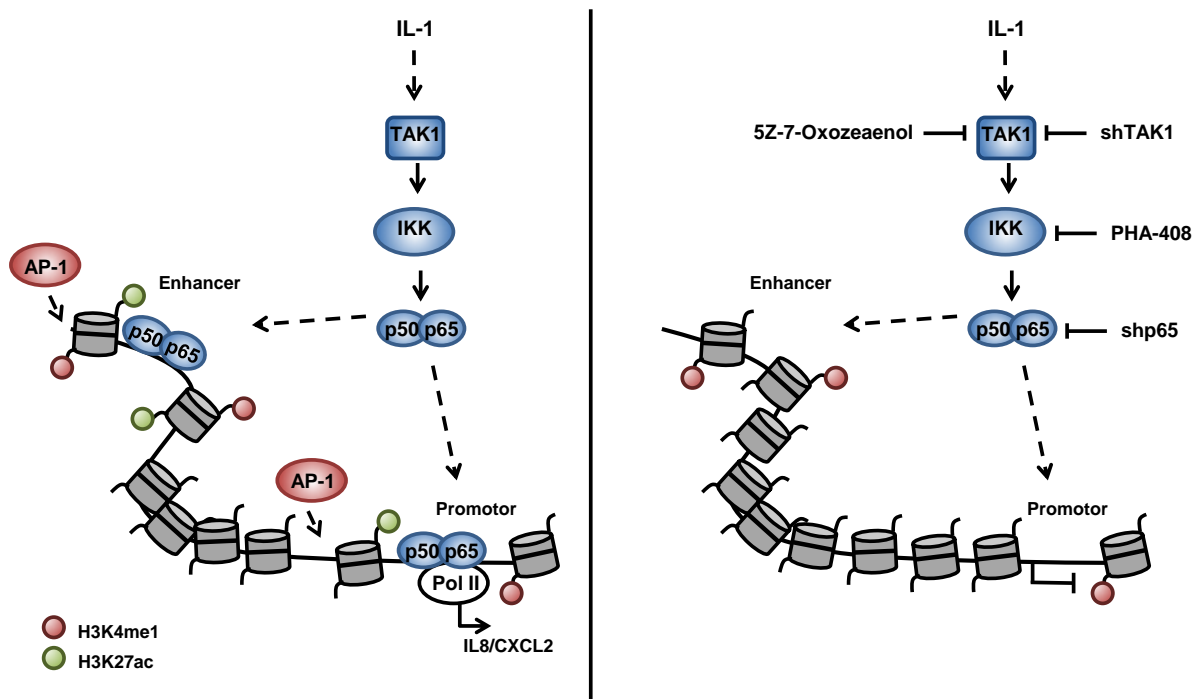


Abbildung 16: Zusammenfassende schematische Darstellung von NF- κ B p65 als Masterregulator an IL-1-induzierbaren Genen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p65 eine zentrale Rolle bei der Öffnung des Chromatins und der Rekrutierung weiterer Faktoren wie z.B. AP-1 Faktoren und RNA-Pol II an die Promotoren bzw. Enhancer von IL-1 induzierten Genen einnimmt. Darüber hinaus ist p65 essentiell für die Formierung von bereits durch H3K4me1 markierten Klasse II Enhancern, indem es die nachfolgende Acetylierung an H3K27 ermöglicht. Die Hemmung der zwei zytosomatischen Kinasen TAK1 und IKK2 grenzte den apikalen Signalweg der p65-abhängigen Effekte näher ein.

5.2 Identifizierung von neuen nukleären Ko-Regulatoren an IL-1-abhängigen Promotoren und Enhancern mittels „*loss-of-function*“-Screening in murinen embryonalen Fibroblasten

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen die Komplexität der Regulation IL-1-abhängiger Gene am Beispiel eines Gen-Clusters. Zahlreiche Faktoren sind offenbar an der parallelen Induktion mehrerer Zielgene beteiligt. Andere Faktoren werden für die Aufrechterhaltung der Transkription oder deren Begrenzung und Termination benötigt. Trotzdem ist die genaue Anzahl aller benötigten oder von der Zelle verwendeten nukleären Faktoren, welche die IL-1 Wirkung im Zellkern molekular regulieren, nicht bekannt. Um neue nukleäre Ko-Regulatoren der IL-1-abhängigen Genexpression zu identifizieren, wurde daher im Folgenden ein „*loss-of-function*“-Screening durchgeführt.

5.2.1 Auswahl der Screening Bedingungen

Für das Screening wurden transiente shRNA-vermittelte *knockdowns* von 170 ausgewählten nukleären Ko-Regulatoren erzeugt. Dafür stand eine nahezu genomweite murine shRNA-Bibliothek aus bakteriellen Dauerkulturen zur Verfügung (TRC1 MISSION® shRNAs, AG Braun, MPI Bad Nauheim). Die Histon-modifizierenden Enzyme und Proteine aus Chromatin-remodellierenden Komplexen wurden vor allem aus zwei Publikationen (Kouzarides, 2007 [182] und Bao & Shen, 2007 [183]) ausgewählt. Eine Liste aller Kandidaten und shRNA Sequenzen wurde dem Anhang angefügt (Abschnitt 7.3). Für jedes Zielgen waren drei bis fünf shRNA Konstrukte verfügbar, die auf dem pLKO.1-Puro Vektorsystem basierten (Abb.19A). Die Plasmid-DNA wurde in Mini-Präparationen aufgereinigt. Für die Durchführung des Screenings wurde eine murine embryonale Fibroblasten Zelllinie (MEF TA7) verwendet. MEFs boten den Vorteil ggf. *knockout*-Modelle für die spätere Validierung und weitere mechanistische Untersuchungen zu benutzen. Die verwendeten TA7-Zellen zeigten eine starke und reproduzierbare IL-1-Responsivität verschiedener Zielgene (Abb.17 und Abb.18) und eine geeignete Transfektionseffizienz. Dazu wurden zunächst verschiedene Transfektionsreagenzien und Plasmidkonzentrationen ausgetestet (Daten nicht gezeigt). Die beste Transfektions-Effizienz dieser Zelllinie erreichte *Lipofectamine LTX Plus Reagent*. Jede Transfektion wurde durch einen GFP-markierten Kontrollvektor mikroskopisch überprüft. Pro Transfektionsplatte wurden drei Kontrollvektoren (pLKO.1-Puro, pLKO.1-Puro *Scramble* shRNA und pLKO.1-Puro-GFP) transfiziert, die für die spätere Normierung der Daten herangezogen werden konnten. Im Gegensatz zu vielen genomweiten RNAi-Screens, die auf artifiziellen Reporter-Gen-Assays basieren, wurden in dieser Arbeit die Effekte auf ein endogenes Zielgen untersucht. Dazu wurde das am stärksten IL-1-regulierte Chemokinen

mCxcl2 ausgewählt. Sowohl in Microarray-Experimenten (Abb.18), als auch in RT-qPCRs einer IL-1 Kinetik (Abb.17), wurde *mCxcl2* als geeignetes Zielgen charakterisiert. Ähnlich wie *mCxcl1*, *mCcl2*, *mCcl7*, *mCcl20*, *mNfkbia* und *mNfkbiz* zeigte *mCxcl2* eine maximale mRNA Induktion nach 1 h IL-1 Stimulation, die nach 3 h wieder verringert war. *mCxcl5* und *mIl6* wiesen eine verzögerte Induktion auf, die nach 3 h oder evtl. erst später ihr Maximum erreichte. *mCxcl10* und *mIcam1* besaßen ihr Maximum dagegen bei 2 h IL-1-Stimulation (Abb.17).

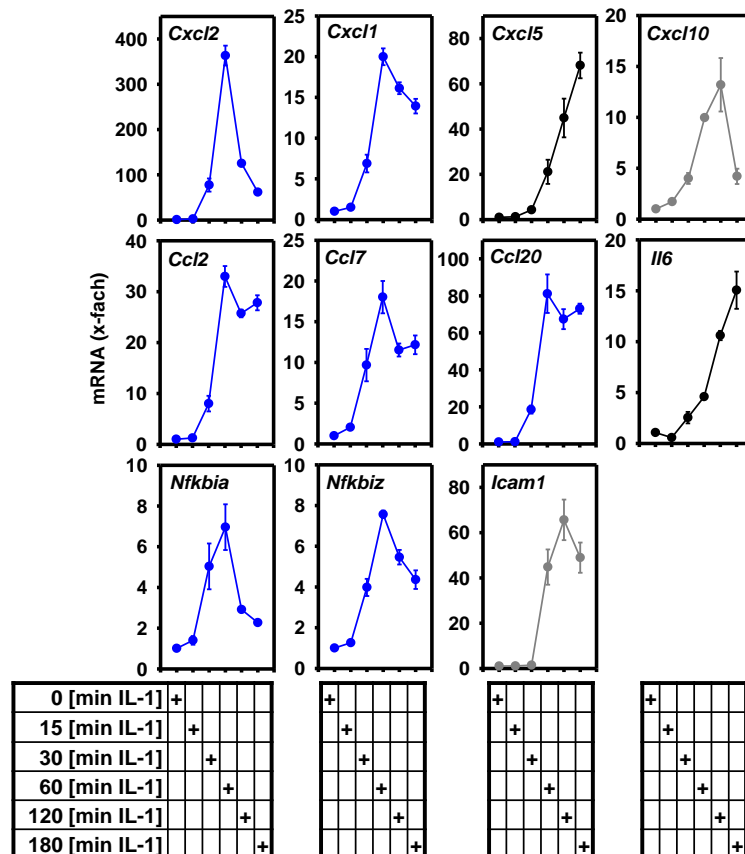


Abbildung 17: Expressionkinetik von IL-1-induzierbaren Zielgenen in murinen embryonalen Fibroblasten (TA7). Die mRNA Expression von ausgewählten IL-1 α Zielgenen wurde nach den angegebenen Stimulationszeitpunkten [10 ng/ml] mittels RT-qPCR quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. als x-fache Regulation aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte wurden auf das Haushaltsgen β -Aktin (*mActB*) und die unbehandelte Kontrolle bezogen.

Mit Hilfe von Microarray-Experimenten (Abb.18A), durchgeführt mit 0,5 h IL-1 Stimulation, wurden 13 IL-1-induzierte Gene (*mCxcl2*, *mCxcl1*, *mCcl20*, *mCxcl10*, *mCcl7*, *mCcl2*, *mCh25h*, *mNfkbiz*, *mCxcl5*, *mIl6*, *mNfkbia*, *mIcam1* und *mVcam1*) ausgewählt, sowie 5 nicht-regulierte „Haushaltsgene“ (*mActB*, *mUbe2l3*, *mEvl*, *mMcm7* und *mCar13*), für die Gen-spezifische Primer (*TaqMan*-Assays) in einer Prä-Amplifikations-PCR eingesetzt wurden (Abb.18A). Die „Haushaltsgene“ wurden durch eine RT-qPCR validiert (Abb.18B). Da

aufgrund der geringen Probenmengen und dem fehlenden RNA-Aufreinigungsschritt im verwendeten Assay keine Konzentrationsbestimmung der eingesetzten RNA möglich war, war die Auswahl mehrerer „Haushaltsgene“ notwendig, um eventuelle Auswirkungen des *knockdowns* auf ein einzelnes „Haushaltsgen“ erfassen zu können und so Schwankungen der Probenmengen auszugleichen.

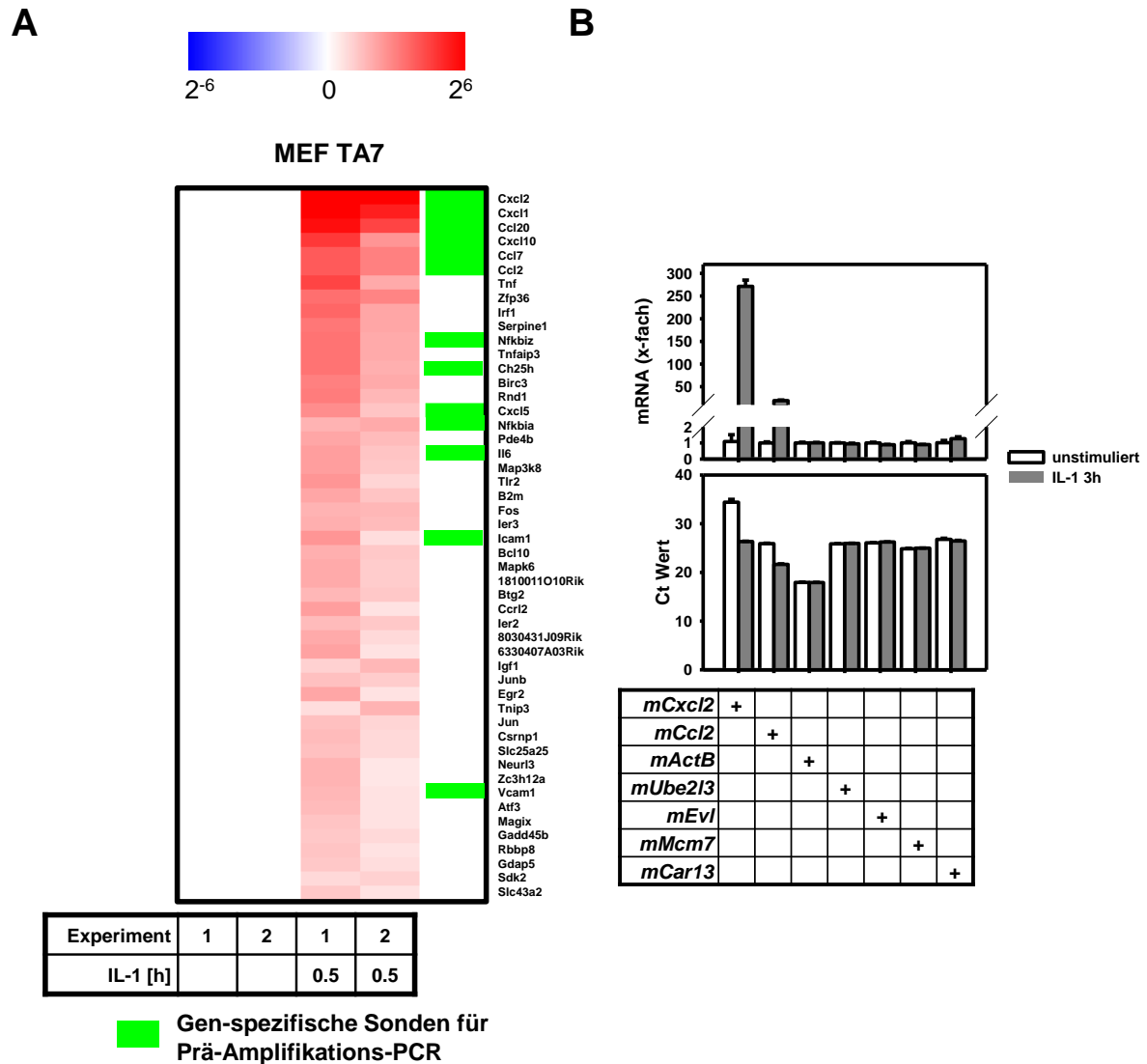


Abbildung 18: Auswahl der IL-1 Zielgene und „Haushaltsgene“ für das spätere RNAi-Screening. Auswahl der IL-1-induzierbaren Zielgene in MEFs, welche als *TaqMan*-Assays in der Prä-Amplifikations-PCR eingesetzt wurden. Gezeigt sind zwei unabhängige Microarray-Experimente mit 30 min IL-1 α [10 ng/ml] Stimulation. Die Werte sind als Log2 Ratios mittels Farbcode dargestellt. Rot markierte Gene werden durch IL-1 verstärkt exprimiert, blau markierte dagegen vermindert, grüne Farben entsprechen den später per *TaqMan*-PCR gemessenen IL-1 Zielgenen. Die Microarray-Daten wurden von Dr. Axel Weber ausgewertet und dargestellt (modifiziert nach [92]) (A). Zusätzlich zu β -Aktin (*mActB*) wurden weitere IL-1-unabhängige „Haushaltsgene“ mittels RT-qPCR überprüft, welche anhand der Microarray-Experimente ausgewählt und ebenfalls als *TaqMan*-Assays in die Prä-Amplifikations-PCR eingesetzt wurden. Dargestellt sind die Werte als x-fache Regulation +/- s.e.m. für die angegebenen mRNAs nach 3 h IL-1 α [10 ng/ml] Stimulation, sowie die gemessenen Ct-Werte +/- s.e.m. als Duplikate (B).

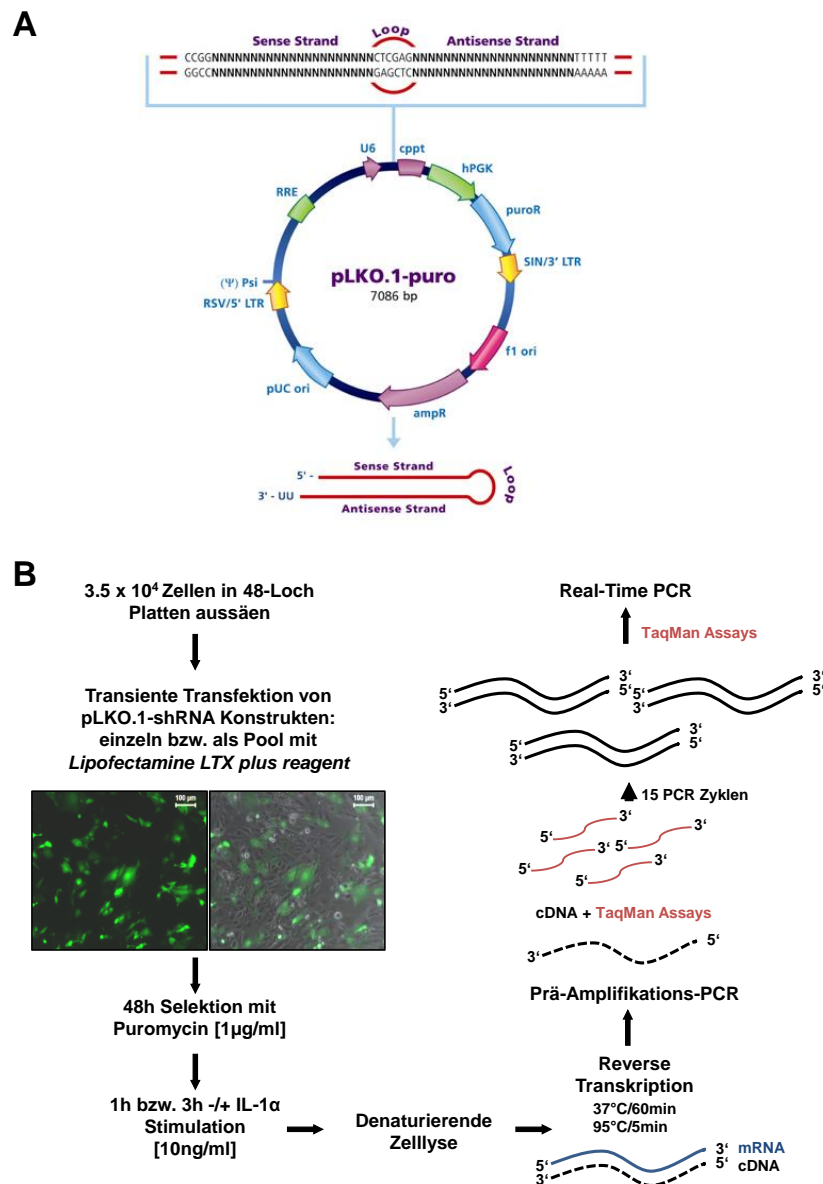


Abbildung 19: Durchführung des Screening-Assays. Schematische Darstellung des pLKO.1-Puro Kontrollvektors bzw. Ausgangsvektors für die shRNA-Sequenzen [184] (A). Schematische Darstellung der Durchführung pro 48-Loch-Transfektionsplatte. 3.5×10^4 Zellen (MEF TA7) wurden in einer 48-Lochplatte ausgesät, am Folgetag transient mit 270 ng Plasmid-DNA von den jeweiligen pLKO.1-shRNA Konstrukten bzw. Kontrollvektoren einzeln (Screen I) oder als Pool (Screen II) mit *Lipofectamine LTX Plus Reagent* transfiziert und für 48 h mit Puromycin (1 $\mu\text{g/ml}$) selektiert. Die Zellen wurden für 3 h (Screen I) bzw. 1 h (Screen II) mit IL-1 α (10 ng/ml) stimuliert. Es folgte eine denaturierende Lyse mit direkter reverser Transkription der RNA. Anschließend wurden ausgewählte *TaqMan*-Assays für eine Prä-Amplifikations-PCR der cDNA verwendet. Die amplifizierten Sequenzen wurden mittels Real-Time PCR quantifiziert (B).

5.2.2 Berechnung und Darstellung von dCt und ddCt Werten zur Identifizierung der stärksten regulatorischen Effekte auf das Zielgen *mCxcl2*

Zur Analyse der *knockdown*-Effekte wurden in der finalen Real-Time PCR von Screen I die Ct-Werte für *mCxcl2* und die beiden „Haushaltsgene“ *mActB* und *mUbe2l3* gemessen (Abb.20A). Beide „Haushaltsgene“ zeigten wie erwartet keine Regulation durch IL-1, während die Expression von *mCxcl2* zunahm. Die Ct-Werte für *mUbe2l3* wiesen geringere Schwankungen auf, als für *mActB*. Für Screen II wurde daher *mUbe2l3* als „Haushaltsgen“ quantifiziert.

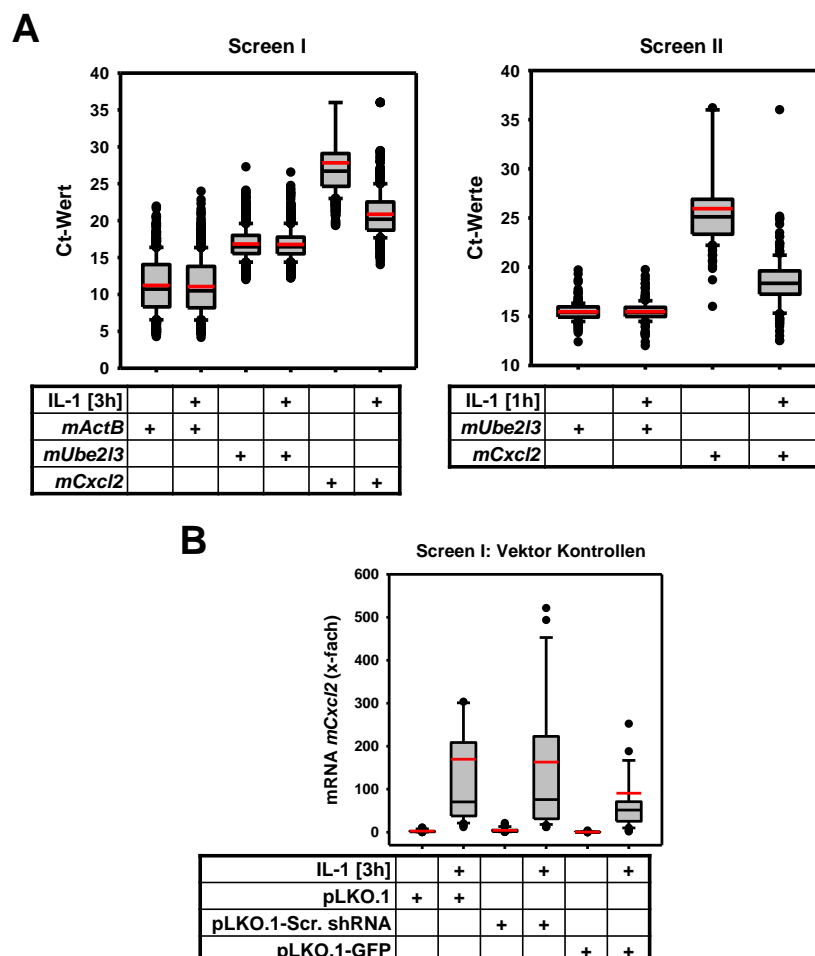


Abbildung 20: Darstellung der in Screen I und II gemessenen Werte. Die *Boxplots* zeigen die Verteilung der in Screen I und II gemessenen Ct Werte der Real-Time PCR Messungen. Der Interquartilsabstand (graue Box) enthält 50% der Werte und besteht aus dem unteren (0.25) und oberen (0.75) Quartil. Der schwarze Median markiert den Mittelwert dieser Datenmenge, während der rote Median den Mittelwert aller Werte darstellt. Die Whisker (1.5x Boxlänge) und Ausreißer definieren die minimalen und maximalen Datenwerte (**A-B**). Gezeigt sind die Ct-Werte für *mActB*, *mUbe2l3* und *mCxcl2* mit und ohne IL-1 α Stimulation [10 ng/ml] aus Screen I (922 Werte) und II (188 Werte) (**A**). Die mRNA Expression für *mCxcl2* aus allen Vektorkontrollen in Screen I ist als x-fache Regulation, auf *mUbe2l3* normiert, dargestellt (43 Werte) (**B**).

Die Verteilung der Werte für die x-fache Regulation von *mCxcl2* der Vektorkontrollen aus Screen I zeigte, dass pLKO.1-Puro GFP eine Hemmung der *mCxcl2* Expression bewirkte und pLKO.1-Puro Scramble shRNA größere Schwankungen als pLKO.1-Puro aufwies (Abb.20B). Die Daten aus Screen I und Screen II wurden daher für die finale Auswertung auf die unstimulierte Vektorkontrolle pLKO.1-Puro bezogen und auf das „Haushaltsgen“ *mUbe2l3* normiert bzw. nicht normiert ausgewertet. Die Berechnungen für delta(d)Ct *mCxcl2* und delta delta(dd)Ct *mCxcl2/mUbe2l3* sind in Abbildung 21 dargestellt. Die berechneten Werte für alle shRNAs wurden nach aufsteigender Reihenfolge auf einer logarithmischen Skala aufgetragen und ein Schwellenwert von Log-2/+2 definiert (Abb.21). Alle *knockdowns* darüber oder darunter zeigten eine mindestens 4-fache De-Regulation von *mCxcl2*.

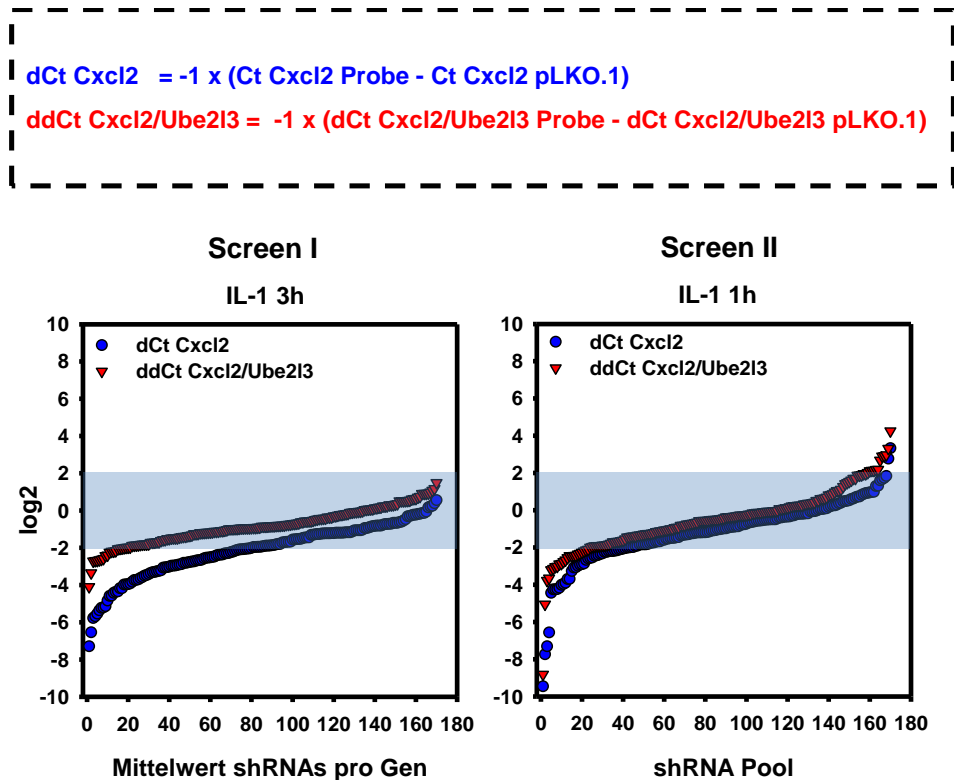


Abbildung 21: Darstellung der dCt und ddCt-Werte aus Screen I und II. Gezeigt sind nach den beschriebenen Formeln berechnete dCt und ddCt-Werte für *mCxcl2* und *mUbe2l3* aus Screen I (IL-1 α 10 ng/ml / 3 h) und II (IL-1 α 10 ng/ml / 1 h). Die Mittelwerte der shRNAs pro Gen (Screen I) bzw. die shRNAs als Pool (Screen II) für alle 170 getesteten Gene sind nach aufsteigender Reihenfolge

aufgetragen (Log2). Es ist ein Schwellenwert von Log-2/2 markiert. Alle Messwerte darüber und darunter weisen eine mindestens 4-fache De-Regulation des Zielgens auf.

Es wurden 16 Kandidaten ausgewählt, die in mindestens drei der vier berechneten Werte den Schwellenwert überschritten. Sie sind in Tabelle 2 dargestellt. Die *knockdowns* von HDAC2, Kdm6a, Phf21a, Sin3a und Padi2 erreichten den Schwellenwert in allen Analysen beider Screens. Alle 16 *knockdowns* wiesen eine starke Hemmung der IL-1-induzierten Expression von *mCxcl2* auf (Tabelle 2).

Nr.	shRNA	Screen I dCt <i>mCxcl2</i>	Screen II dCt <i>mCxcl2</i>	Screen I ddCt <i>mCxcl2</i> <i>mUbe2l3</i>	Screen II ddCt <i>mCxcl2</i> <i>mUbe2l3</i>
1	HDAC2	-3.73	-2.16	-2.72	-2.43
2	Kdm6a	-2.90	-7.30	-2.70	-5.05
3	Phf21a	-3.24	-2.07	-2.24	-2.19
4	Sin3a	-3.83	-3.69	-2.06	-3.04
5	Padi2	-4.37	-2.59	-2.66	-2.10
6	Sirt7	-2.79	-1.83	-2.01	-2.26
7	Ep300	-2.49	-3.08	-1.81	-3.13
8	Taf1	-3.70	-6.56	-1.19	-2.45
9	Ncoa1	-3.07	-4.17	-2.03	-0.72
10	Ehmt2	-5.68	-1.68	-2.59	-2.56
11	Suv420h1	-4.84	-2.90	-2.69	-1.91
12	Ring1	-2.51	-3.06	-0.71	-2.45
13	Sin3b	-2.05	-3.27	-1.88	-3.20
14	Epc1	-2.09	-4.25	0.34	-2.14
15	Padi4	-7.29	-4.01	-3.36	-1.92
16	NCor2	-2.95	-7.73	-1.18	-3.65

Tabelle 2: Die *knockdowns* von sechzehn ausgewählten Ko-Regulatoren zeigten eine mindestens 4-fache Verminderung der *mCxcl2* mRNA. Dargestellt sind die dCt und ddCt-Werte von sechzehn ausgewählten shRNAs. Die Auswahlkriterien wurden so definiert, dass mindestens drei der vier berechneten Werte über dem festgelegten Schwellenwert von Log-2/+2 (4-fache De-Regulation) lagen.

5.2.3 Validierung der Screening Ergebnisse und Untersuchung der Effekte auf weitere IL-1 Zielgene

Um die Effekte der 16 identifizierten nukleären Ko-Regulatoren zu validieren, wurde in einem größeren Maßstab eine Standard RT-qPCR Analyse der mRNA-Expression nach 1 h IL-1 Stimulation von *mCxcl2*, aber auch von weiteren IL-1 Zielgenen in MEF TA7 durchgeführt (Abb.22). Auch hier wurden alle Werte auf die unstimulierte pLKO.1-Puro Vektorkontrolle bezogen und auf *mUbe2l3* normiert.

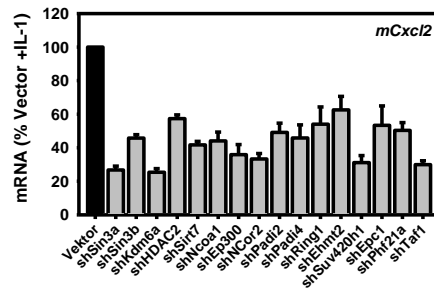
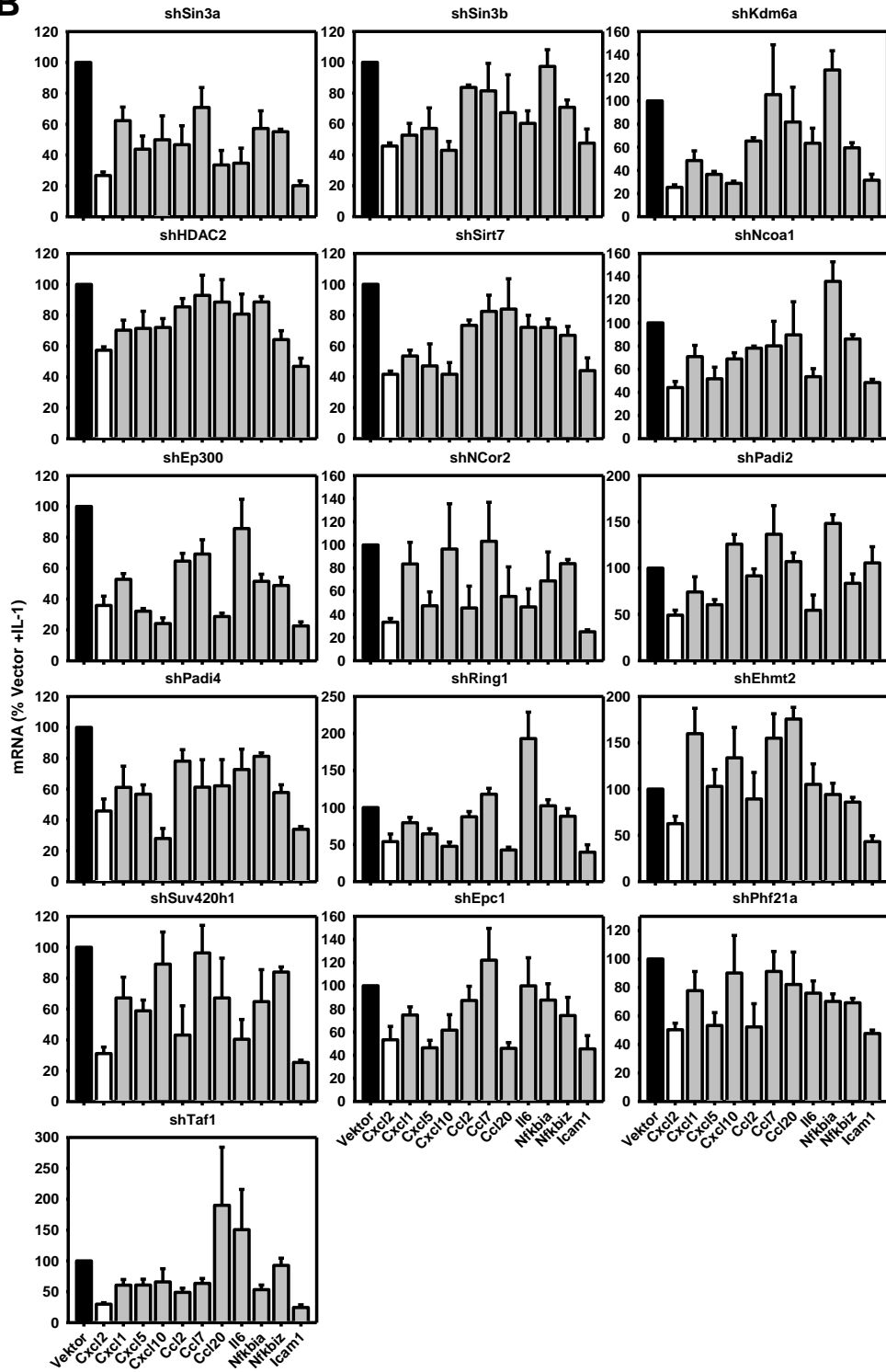
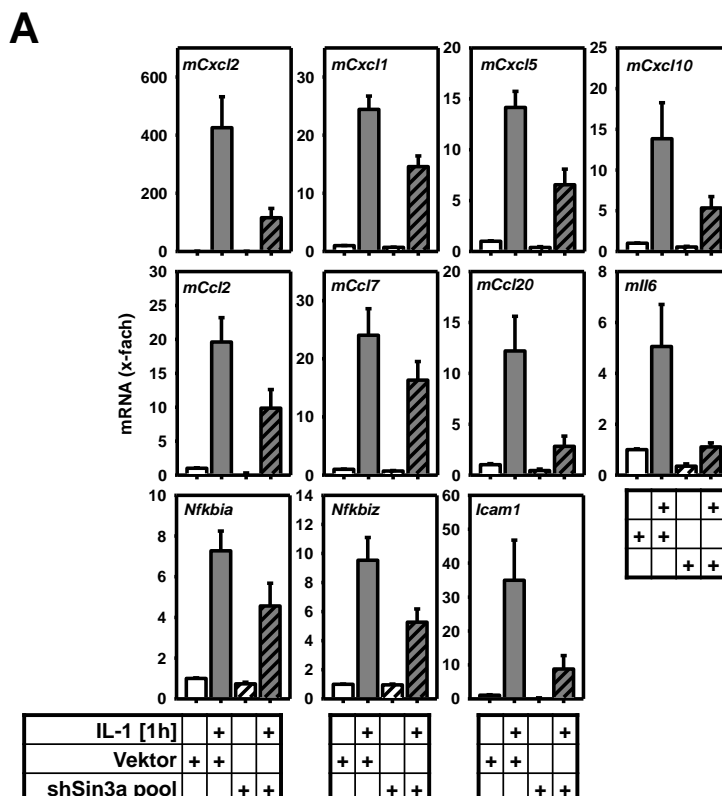
A**B**

Abbildung 22: Validierung der Screening Ergebnisse für 16 ausgewählte Ko-Regulatoren und Expressionsanalysen weiterer IL-1 Zielgene. MEF TA7 wurden mit pLKO.1 Kontrollvektor bzw. shRNA Pool für die angegebenen Zielproteine mittels *Lipofectamine LTX Plus Reagent* transfiziert, für 48 h mit 1 µg/ml Puromycin selektiert und mit IL-1 α [10 ng/ml] für 1 h stimuliert bzw. nicht behandelt. Die mRNA Expression für die beschriebenen IL-1-stimulierten Gene wurde mittels RT-qPCR quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte als Prozent der x-fachen Regulation der IL-1-stimulierten Vektorkontrolle +/- s.e.m. von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Vektorkontrolle entspricht 100% (A-B). Abbildung (A) enthält die Daten für das Screen-Zielgen *mCxc12*, Abbildung (B) zusätzlich gemessene IL-1 Zielgene.

Es bestätigte sich die Rolle von allen 16 im Screen ermittelten Kandidaten als Ko-Aktivatoren von *mCxc12* (Abb.22A). Dagegen waren die Effekte der *knockdowns* dieser Proteine auf weitere IL-1 Zielgene sehr variabel (Abb.22B). Einige zeigten ebenfalls eine Reduktion, keinen Effekt oder sogar eine Induktion nach IL-1-Stimulation. Die *knockdowns* von Sin3a, Sirt7, Ep300 und Padi4 wiesen jedoch für alle gemessenen Zielgene eine mindestens 20%ige Reduktion nach 1 h IL-1 Stimulation auf (Abb.22B).

5.2.4 Einfluss der Depletion von Sin3a auf die IL-1-induzierbare Genexpression

In Abbildung 23A sind die in den Validierungsexperimenten ermittelten Effekte eines Sin3a-*knockdowns* auf weitere IL-1 Zielgene noch einmal als x-fache Regulation separat dargestellt, um auch die unterschiedlichen mRNA-Expressionslevel vergleichen zu können.



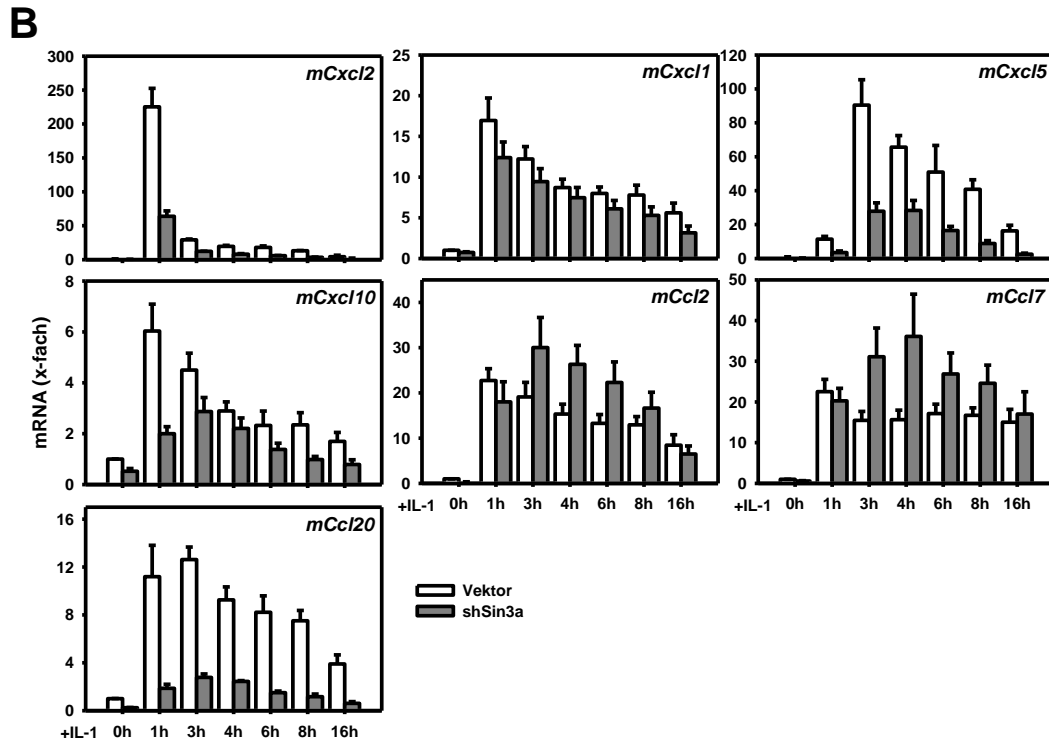


Abbildung 23: Differentieller Einfluss der Depletion von mSin3a auf die IL-1-induzierbare Genexpression. MEF TA7 wurden mit pLKO.1 Kontrollvektor bzw. shRNA Pool für die beschriebenen Zielproteine mittels *Lipofectamine LTX Plus Reagent* transfiziert, für 48 h mit 1 µg/ml Puromycin selektiert und mit den beschriebenen IL-1α Zeitpunkten [10 ng/ml] stimuliert bzw. nicht behandelt. Die mRNA Expression für die genannten IL-1-stimulierten Gene wurde mittels RT-qPCR quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte als x-fache Regulation +/- s.e.m von mindestens drei (A) bzw. mindestens zwei (B) unabhängigen Experimenten. Die Daten aus (A) sind bereits als Prozentwerte in Abbildung 22 integriert.

Zusätzlich wurde eine IL-1 Zeitreihe durchgeführt, um zu testen, inwieweit der suppressive Phänotyp des Sin3a-*knockdowns* auf IL-1 Zielgene zu jedem Zeitpunkt detektierbar war (Abb.23B). Hier konnte gezeigt werden, dass ein transienter Sin3a-*knockdown* verschiedene Effekte auf die gemessenen mRNA-Mengen von IL-1 Zielgenen besaß. So wiesen *mCxc12*, *mCxc11* und *mCcl20* zu allen IL-1 Zeitpunkten eine gleichmäßige Reduktion in den *knockdown*-Zellen auf, während *mCxc15* und *mCxc10* eine Verschiebung der Induktions-Maxima zu späteren Zeitpunkten zeigten. Die maximale Expression war im *knockdown* dennoch reduziert. Für *mCcl2* und *mCcl7* waren die Induktions-Maxima ebenfalls zu späteren Stimulationszeitpunkten verschoben, wobei die maximalen mRNA-Mengen im *knockdown* sogar die Vektorkontrolle überstiegen (Abb. 23B). Die Proteinmengen in Vektorkontroll-Zellen und Sin3a-*knockdown* Zellen wurden im Westernblot überprüft (Abb.24A, 24C). In Ganzzelllysaten zeigte sich eine Verminderung der Sin3a Proteinmenge, die sich auch reduzierend auf die p65 Proteinmenge auswirkte. Die RNA-Pol II war im *knockdown* dagegen nicht beeinflusst (Abb.24A). Eine transiente Überexpression von

aufsteigenden Mengen an mSin3a-MYC bewirkte eine Zunahme der p65 Proteinmenge (Abb.24B). Um die Zellen komplett aufzuschließen und die Fraktionen zu trennen, wurde eine fraktionierte Lyse durchgeführt (Abb.24C). Hier wurden die Sin3a und p65 Mengen quantifiziert. Sin3a war hauptsächlich in N1 (lösliche Kernfraktion) und N2 (Chromatinfraktion) lokalisiert. Auch hier war ein partieller *knockdown* von Sin3a nachweisbar (35-38% in N1). Dieser *knockdown* wirkte sich in Zytosol und N1 nicht auf die p65 Proteinmenge aus, während in N2 eine Reduktion von p65 von 24% auf 18% detektiert werden konnte.

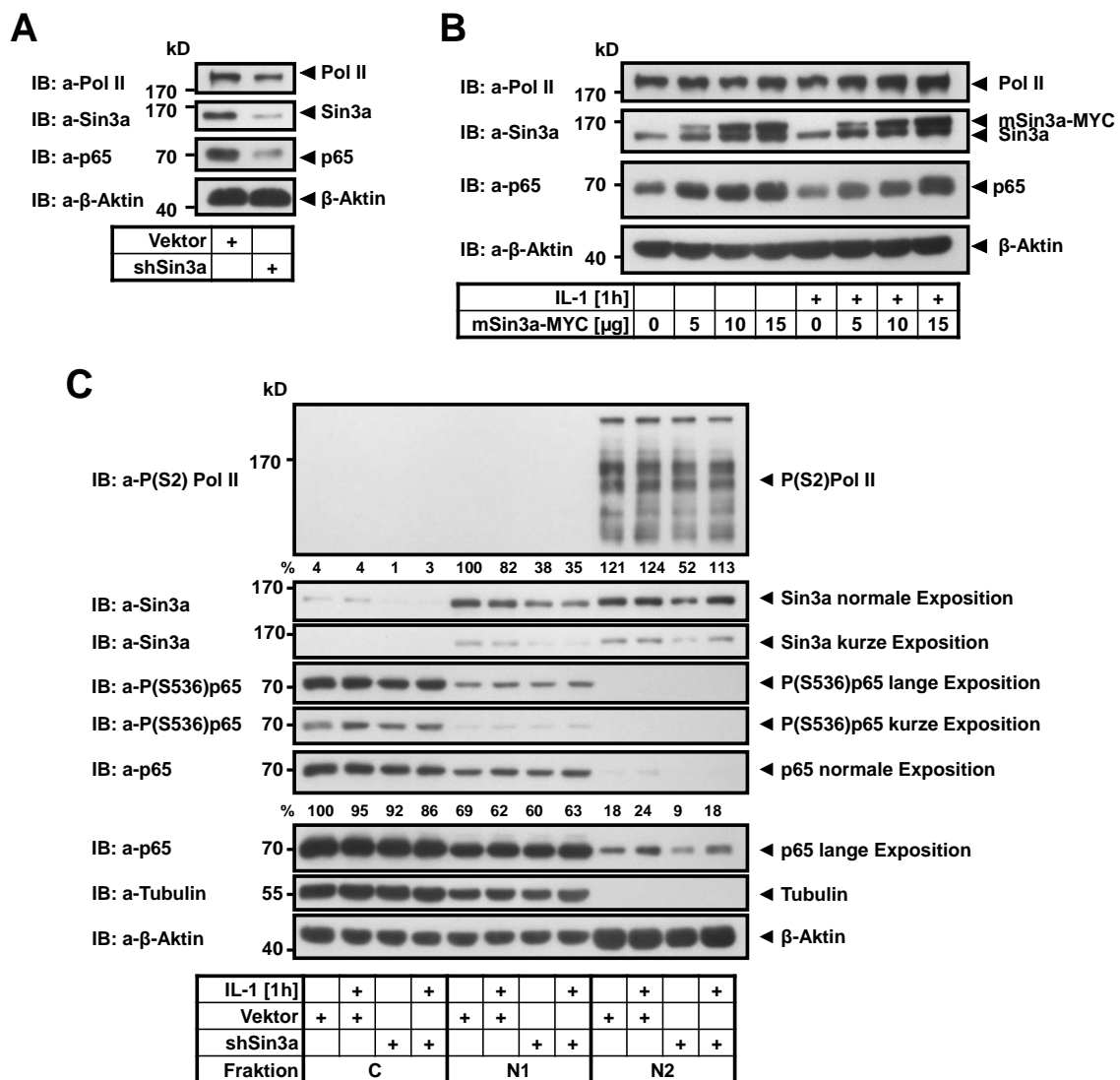


Abbildung 24: Einfluss von mSin3a auf die p65 Proteinmenge in murinen embryonalen Fibroblasten. MEF TA7 wurden mit pLKO.1 Kontrollvektor bzw. shSin3a Pool mittels *Lipofectamine LTX Plus Reagent* transfiziert und für 48 h mit 1 μg/ml Puromycin selektiert. Die Proteinmengen wurden im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern überprüft (A). MEF TA7 wurden mit pCS2+MT-MYC Kontrollvektor bzw. mSin3a-MYC in der beschriebenen Konzentrationsreihe mittels *Lipofectamine LTX Plus Reagent* transfiziert, 1 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert bzw. nicht behandelt und 24 h nach der Transfektion lysiert. Die Proteinmengen wurden im Immunoblot analysiert (B). Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt. Nach 1 h IL-1α Stimulation [10 ng/ml] erfolgte die Präparation von zytosolischer (C), löslicher (N1) und unlöslicher (N2) Kernfraktion. Die Proteinmengen

und Lokalisation von Sin3a, P-p65, p65 und P(S2)-Pol II wurden im Westernblot untersucht. β -Aktin, Tubulin und P(S2)-Pol II dienten als Ladungs- bzw. Reinheitskontrollen für jede zelluläre Fraktion. Die Signale für Sin3a und p65 wurden anschließend relativ zur unbehandelten Vektorkontrolle quantifiziert [%] (C).

Zusammenfassend zeigen die in Kapitel 5.2 dargestellten Ergebnisse, dass durch einen gezielten RNAi-Screen neue potentielle nukleäre Ko-Regulatoren des IL-1 Signalwegs identifiziert werden konnten. Alle sechzehn ausgewählten Kandidaten besaßen Aktivator-Funktionen auf die IL-1-induzierte Expression von *mCxcl2*, da ihr *knockdown* eine mindestens 4-fache Reduktion des mRNA Levels bewirkte (Abb.25). In Validierungsexperimenten konnten die Effekte auf *mCxcl2* bestätigt werden, während sich die *knockdowns* auf andere IL-1 Zielgene unterschiedlich auswirkten. Für Sin3a wurde zusätzlich gezeigt, dass der *knockdown* zu einer verminderten p65 Proteinmenge führte und sich negativ auf die Expression mehrerer IL-1 Zielgene auswirkte. Teilweise waren die Expressionsprofile zu späteren IL-1 Zeitpunkten verschoben, im Fall von *mCcl2* und *mCcl7* führte der *knockdown* sogar zu einer gesteigerten Expression. Der Screen führte damit zur Detektion einer Gruppe an nukleären Kofaktoren, die differentielle und genspezifische Effekte auf die Expression von IL-1 Zielgenen ausüben.

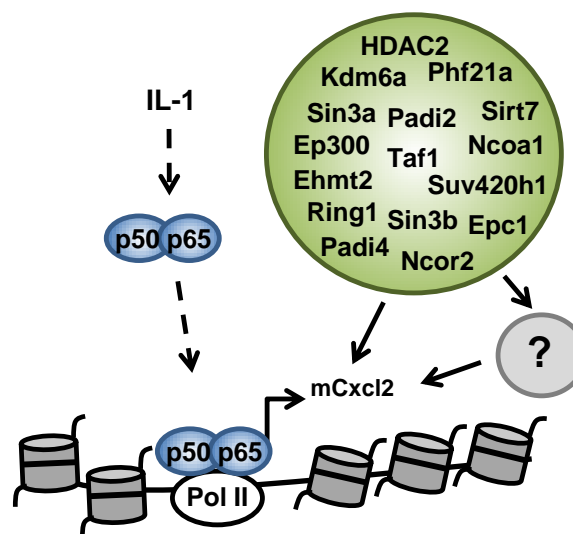


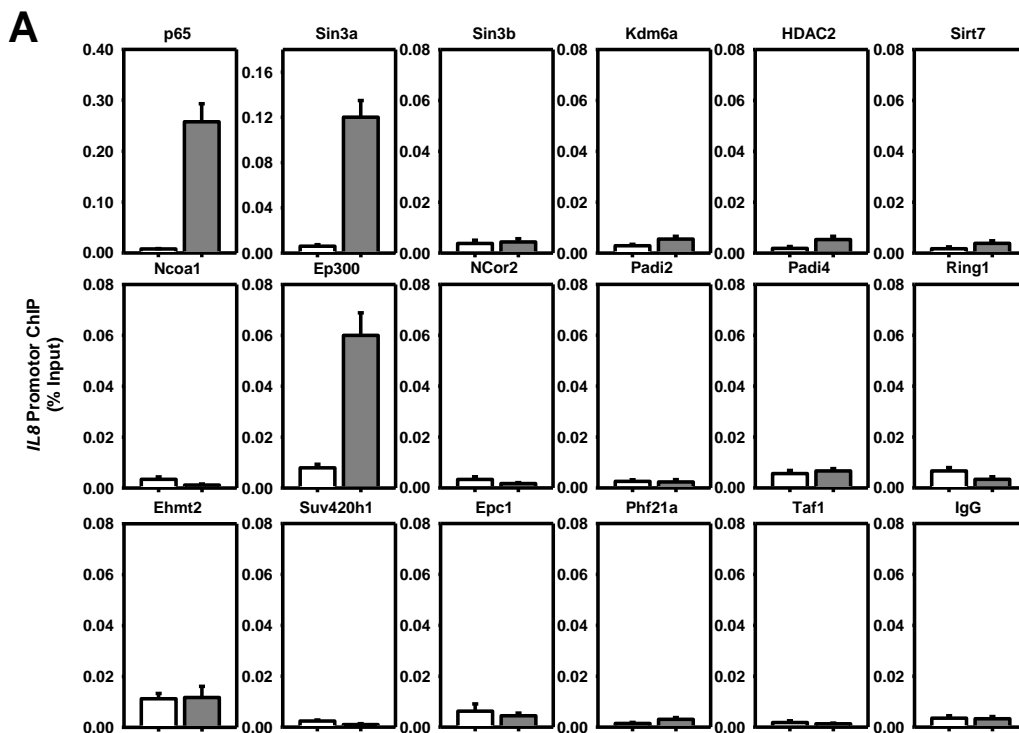
Abbildung 25: Zusammenfassende schematische Darstellung der im RNAi-Screening ermittelten Ko-Regulatoren auf das IL-1 Zielgen *mCxcl2*. Mittels RNAi-Screening wurden sechzehn potentielle Ko-Regulatoren ermittelt, die eine Aktivator-Funktion für das IL-1-induzierte Zielgen *mCxcl2* in murinen embryonalen Fibroblasten besitzen.

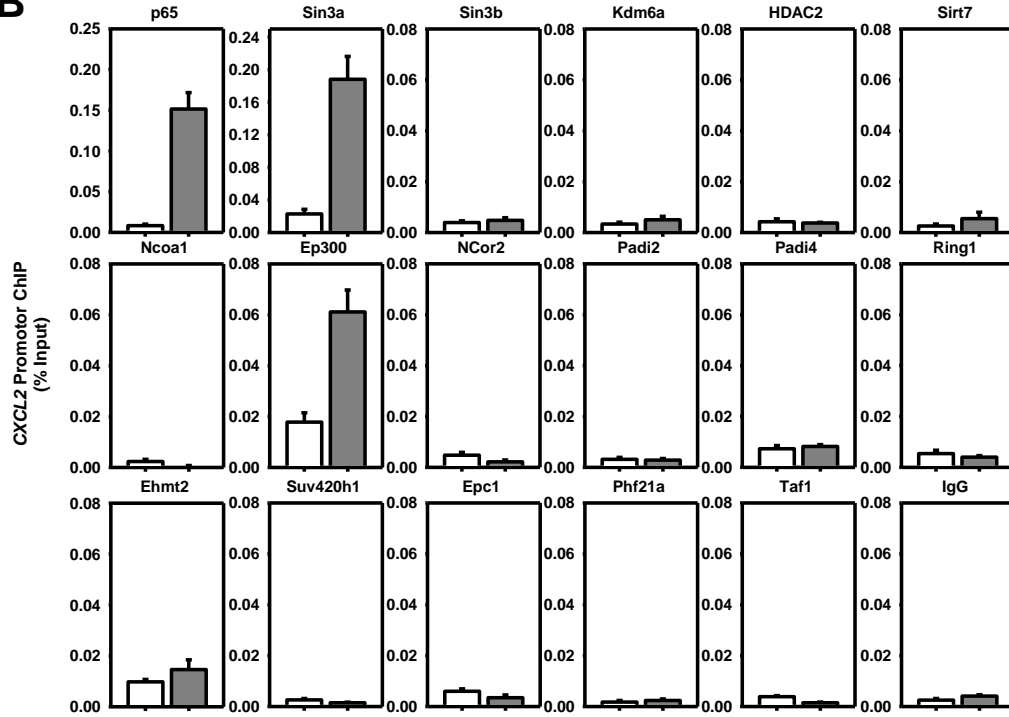
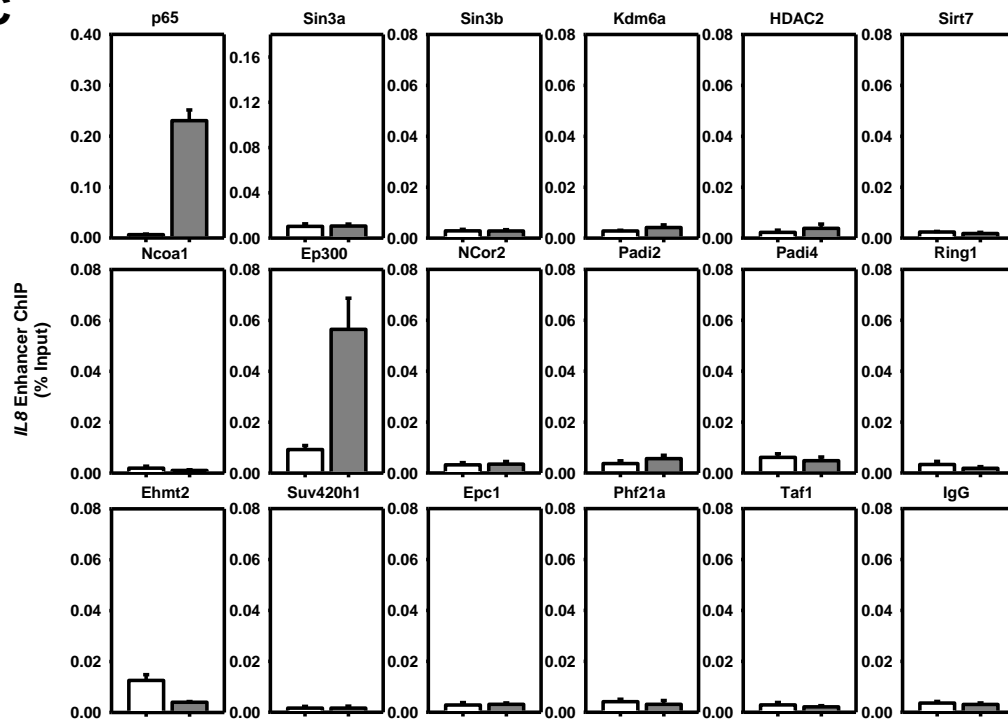
5.3 Bindungsanalysen der im Screening ermittelten Ko-Faktoren an NF- κ B Zielgenen

Es stellte sich daher die Frage, ob die im RNAi-Screening ermittelten Ko-Faktoren direkt an IL-1 regulierte Zielgene binden, oder ob die Auswirkungen auf die Zielgene auf indirekten Effekten beruhen. Um eine direkte Bindung nachzuweisen, wurden ChIP Experimente in murinen und humanen Zellsystemen durchgeführt.

5.3.1 IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a

Zunächst wurden ChIP Experimente in humanen KB Zellen für alle sechzehn Ko-Regulatoren am *IL8* und *CXCL2* Promotor und Enhancer, sowie einer genfreien Negativkontroll-Region durchgeführt (Abb. 26). Nach 1 h IL-1 Stimulation konnte neben der Bindung von p65 eine IL-1-induzierte Rekrutierung von Sin3a und Ep300 an beiden Promotoren detektiert werden (Abb.26A, 26B). Im Gegensatz zu Sin3a zeigte Ep300 auch eine IL-1-abhängige Rekrutierung an den beiden Enhancern (Abb.26C, 26D). Die Negativkontrollprimer (Abb.26E) und IgG Kontrollen schlossen unspezifische Bindungen aus. Für alle weiteren verwendeten Antikörper konnte keine spezifische Bindung nachgewiesen werden.



B**C**

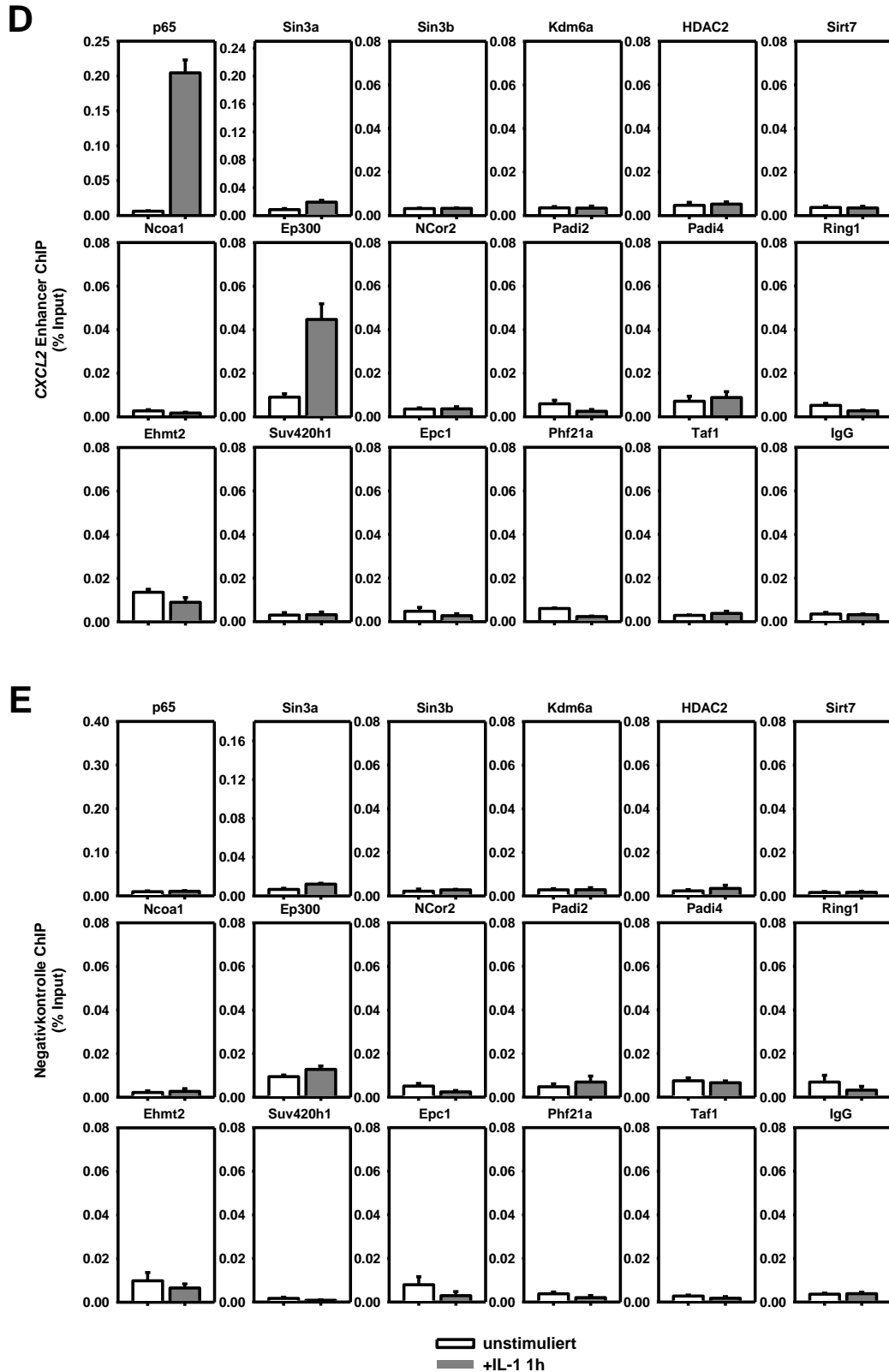


Abbildung 26: IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a an die *IL8* und *CXCL2* Promotoren in humanen KB Zellen. In KB Zellen wurden Bindungsanalysen der sechzehn im RNAi-Screening ermittelten Ko-Faktoren durchgeführt. Die Zellen wurden dazu mit IL-1 α für 1 h (10 ng/ml) stimuliert bzw. nicht behandelt. Mittels ChIP wurde dazu der *IL8* Promotor (A) und Enhancer (C), *CXCL2* Promotor (B) und Enhancer (D) bzw. eine genfreie Region (Negativkontrolle) (E) mittels Real-Time PCR analysiert. Als Positivkontrolle diente die IL-1-abhängige p65 Bindung an den beiden Promotoren

und Enhancern. IgG-IPs wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus mindestens zwei, maximal sieben unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zum humanen Zellsystem wurde anschließend die IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a in murinen embryonalen Fibroblasten analysiert (Abb.27). Dazu wurde in zwei MEF-Zelllinien (MK2/5 und TA7) der *mCcl2*-Locus auf eine Bindung untersucht. Der *mCcl2* Promotor enthält kein klassisches NF- κ B Motiv, während der Enhancer zwei Motive beinhaltet [185]. Bei beiden MEF Zelllinien konnte p65 nach IL-1 Stimulation nur am *mCcl2* Enhancer, nicht aber am Promotor detektiert werden. Die aktive P(S5)-Pol II und Sin3a zeigten dagegen nur am Promotor eine IL-1-induzierbare Rekrutierung (Abb. 27).

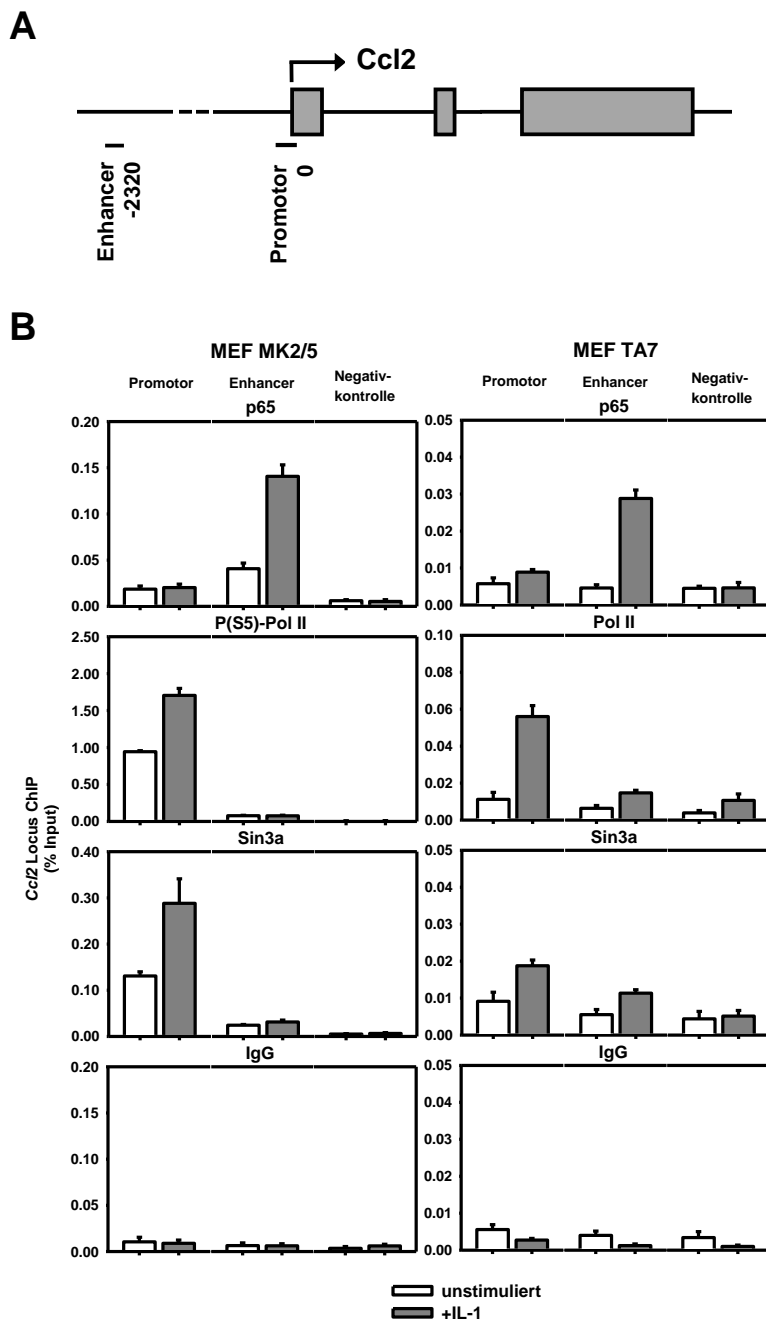
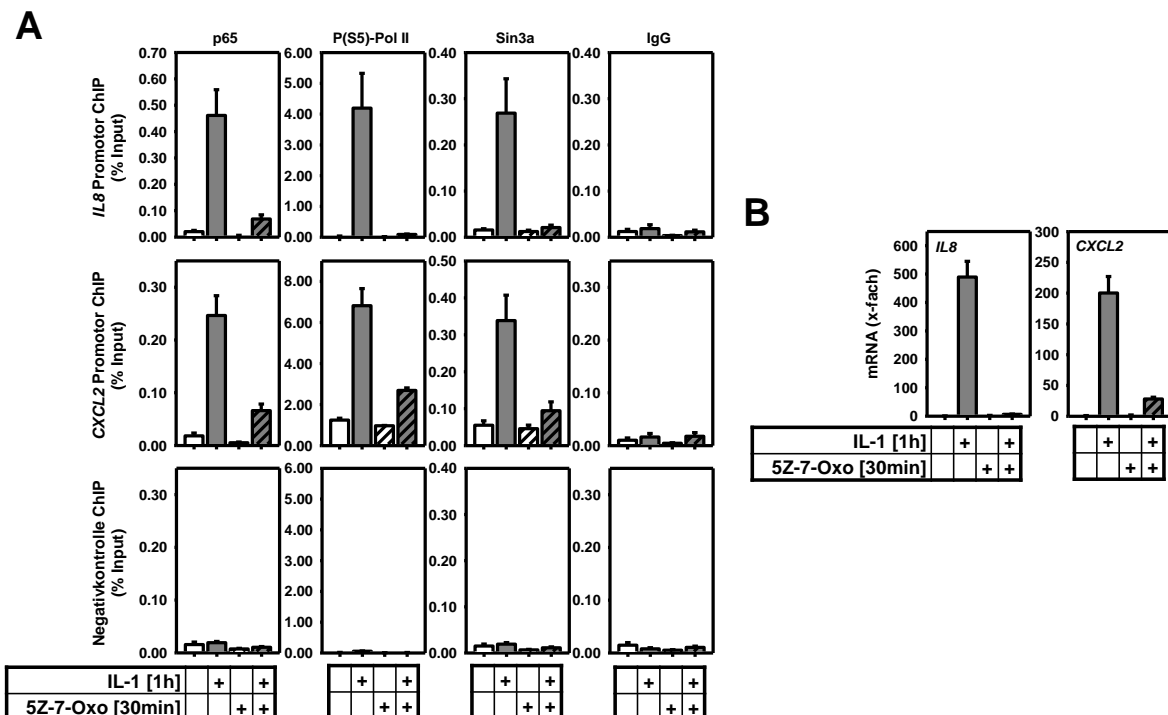


Abbildung 27: IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a an den *mCcl2* Promotor in murinen embryonalen Fibroblasten. Schematische Darstellung des murinen *mCcl2* Locus (A). MEF Zelllinien (MK2/5, TA7) mit und ohne 1 h IL-1 α (10 ng/ml) Stimulation wurden mittels ChIP und Real-Time PCR auf eine Sin3a Bindung analysiert. Dabei wurde der *mCcl2* Promotor und Enhancer, sowie eine genfreie Region *upstream* von *mCxc15* (Negativkontrolle) untersucht. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (B).

Zusammenfassend konnte in humanen und murinen Zellsystemen eine Rekrutierung von Sin3a nach einer IL-1 Stimulation an Promotoren von NF- κ B Zielgenen nachgewiesen werden, während regulatorische Enhancer-Strukturen keine Bindung aufwiesen. Der Ko-Aktivator Ep300 zeigte dagegen eine Rekrutierung zu IL-1-abhängigen Promotoren und Enhancern in humanen KB Zellen.

5.3.2 Einfluss von TAK1 und IKK2 auf die Rekrutierung von Sin3a

Um die vorgeschalteten Signalwege der IL-1-induzierten Sin3a Rekrutierung zu untersuchen, wurden zwei zytoplasmatische Schlüsselkomponenten des IL-1 Signalwegs in humanen Zellen blockiert: TAK1 und IKK2. Wie bereits in Kapitel 5.1.4 gezeigt, spielen TAK1 und IKK2 eine essentielle Rolle für die IL-1-abhängigen Bindungsereignisse und die induzierte Acetylierung von H3K27.



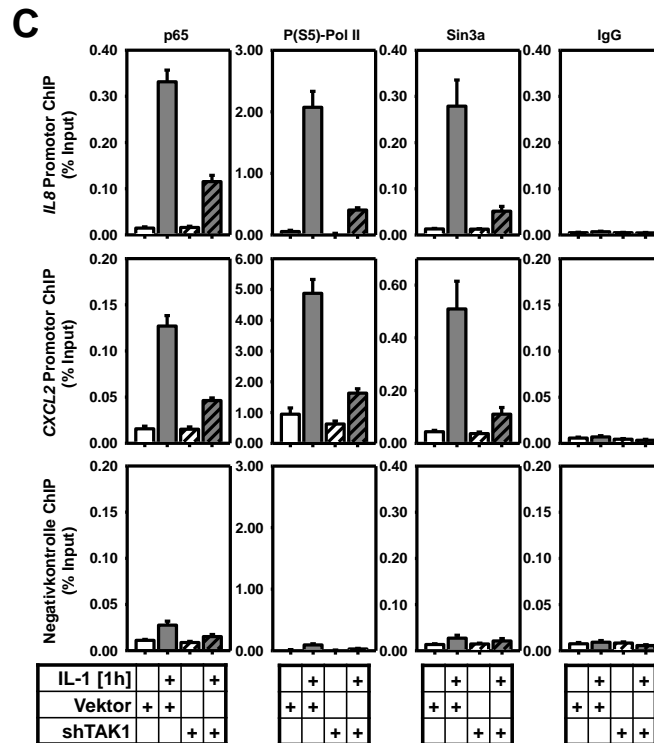


Abbildung 28: Die Sin3a Rekrutierung ist TAK1-abhängig. KB Zellen wurden in der angegebenen Kombination mit dem TAK1-Inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol [1 μ M/ 30 min] vorbehandelt und mit IL-1 α (10 ng/ml/ 1 h) stimuliert bzw. nicht behandelt (**A-B**). Die Analyse der 5Z-7-Oxozeaenol Effekte erfolgte über ChIP Experimente und Real-Time PCR. Dabei wurden die Promotoren von *IL8* und *CXCL2*, sowie eine genfreie Region (Negativkontrolle) untersucht (in Abbildung 7 dargestellt). IgG-IPs dienten als Negativkontrolle. Für die jeweiligen Antikörper sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus mindestens zwei, maximal vier unabhängigen Experimenten gezeigt (**A**). Die mRNA Expression wurde mittels RT-qPCR analysiert und als x-fache Regulation relativ zur unbehandelten Kontrolle von fünf unabhängigen Experimenten angegeben (**B**). HeLa Zellen wurden mit pLKO.1 Kontrollvektor bzw. pLKO.1-shTAK1 transfiziert, 48 h mit Puromycin [1 μ g/ml] selektiert und mit IL-1 α [10 ng/ml/ 1 h] stimuliert bzw. nicht behandelt. Die ChIP wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt und analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus fünf unabhängigen Experimenten. Die Daten sind teilweise bereits in Abbildung 13C integriert (**C**).

TAK1 wurde zunächst in KB Zellen mit dem Kinase Inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol blockiert und die Bindungsereignisse am Chromatin mittels ChIP analysiert (Abb.28A). Wie bereits bekannt, wurden die IL-1-abhängigen Bindungen von p65 und RNA-Pol II an den beiden Promotoren von *IL8* und *CXCL2* durch die Inhibition von TAK1 stark reduziert. Dies wirkte sich auch negativ auf die mRNA Expression der beiden Zielgene aus (Abb.28B). Die Sin3a Rekrutierung war in den 5Z-7-Oxozeaenol-behandelten Zellen ebenfalls deutlich gehemmt (Abb. 28A). Die Effekte des Inhibitors wurden anschließend mit Hilfe eines *knockdowns* von TAK1 in HeLa Zellen validiert (Abb.13, 28C). Auch hier hemmte die Reduktion der TAK1 Proteinmenge alle nachfolgenden Bindungsereignisse an den beiden untersuchten Promotoren.

TAK1 führt in der IL-1 Signalkaskade unter anderem zur Aktivierung des IKK-Komplexes. Durch den Inhibitor PHA-408 wurde in KB Zellen die Kinase IKK2 blockiert und die IL-1-induzierten Bindungsereignisse am Chromatin mittels ChIP untersucht (Abb.11, 29). Auch hier kam es durch die Inhibition des zytoplasmatischen IL-1 Signalwegs zur reduzierten Bindung von p65, RNA-Pol II und Sin3a an den beiden Promotoren (Abb.29). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die IL-1-induzierte Sin3a Rekrutierung an die *IL8* und *CXCL2* Promotoren von TAK1 und IKK2 abhängig ist.

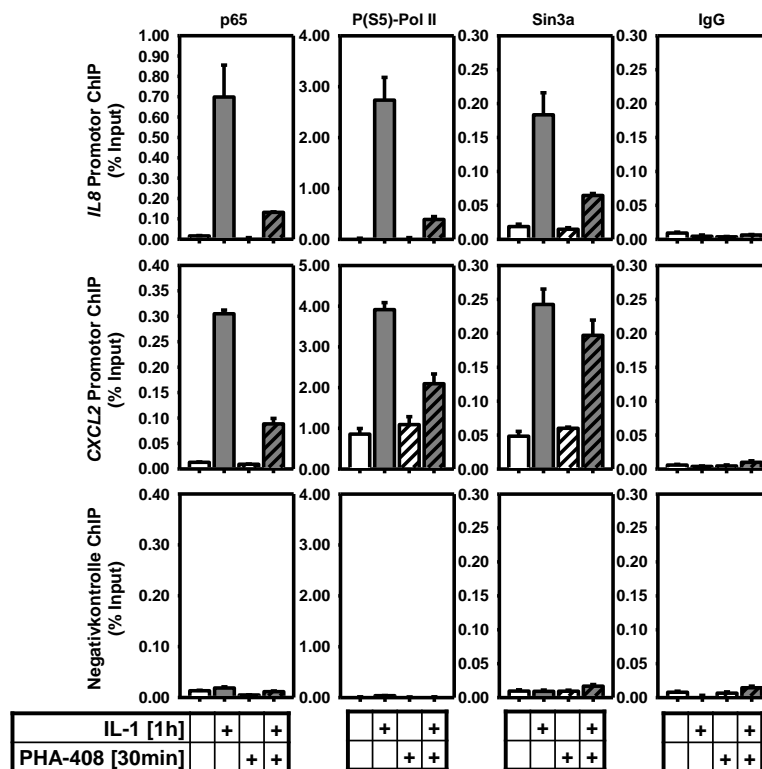


Abbildung 29: Die Sin3a Rekrutierung ist IKK2-abhängig. KB Zellen wurden in der angegebenen Kombination mit dem IKK2-Inhibitor PHA-408 [5 µM/ 30 min] vorbehandelt und mit IL-1α (10 ng/ml/ 1 h) stimuliert bzw. mit DMSO behandelt. Die Analyse der PHA-Effekte erfolgte über ChIP Experimente und Real-Time PCR. Dabei wurden die Promotoren von *IL8* und *CXCL2*, sowie eine genfreie Region (Negativkontrolle) untersucht (in Abbildung 7 dargestellt). IgG-IPs dienten als Negativkontrolle. Für die jeweiligen Antikörper sind die Mittelwerte +/- s.e.m [% Input] aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Daten sind teilweise in Abbildung 11E integriert.

5.3.3 Einfluss von HDACs auf die Sin3a Rekrutierung

Sin3a wird häufig als Ko-Repressorkomplex mit HDACs zusammen aufgereinigt und daher funktionell mit einer Korepressoraktivität in Verbindung gebracht. Hierbei vermitteln die Histondeacetylasen HDAC1 und 2 die katalytische Aktivität des Komplexes und können aktivierende Histonacetylierungen entfernen [120, 186]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Aktivität von Klasse I und II Histondeacetylasen für die Sin3a Rekrutierung benötigt wird

(Abb.30). Dazu wurde der HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet, welcher die Aktivität von Klasse I und II HDACs hemmt und somit zu einer Hyperacetylierung von Histonen führt [187].

Zunächst wurden verschiedene TSA Konzentrationen im Westernblot analysiert (Abb.30C). Ab einer Konzentration von 200 ng/ml TSA war eine deutlich verstärkte Acetylierung von Histon H3 und H4 an selektiven Lysinen detektierbar. Für anschließende ChIP-Experimente und RT-qPCRs wurden 300 ng/ml TSA verwendet. Eine TSA-Behandlung in KB-Zellen bewirkte eine deutliche Hemmung der *CXCL2* mRNA-Menge, eine geringe Beeinflussung der *IL8* mRNA-Menge (Abb. 30B) und kaum Veränderungen bei der Rekrutierung von p65, RNA-Pol II und Sin3a an die *IL8* und *CXCL2* Promotoren (Abb. 30A). Diese Daten zeigen, dass eine globale Hemmung von Klasse I und II HDACs durch TSA die Sin3a Rekrutierung an den untersuchten IL-1 Zielgenen nicht beeinflusst.

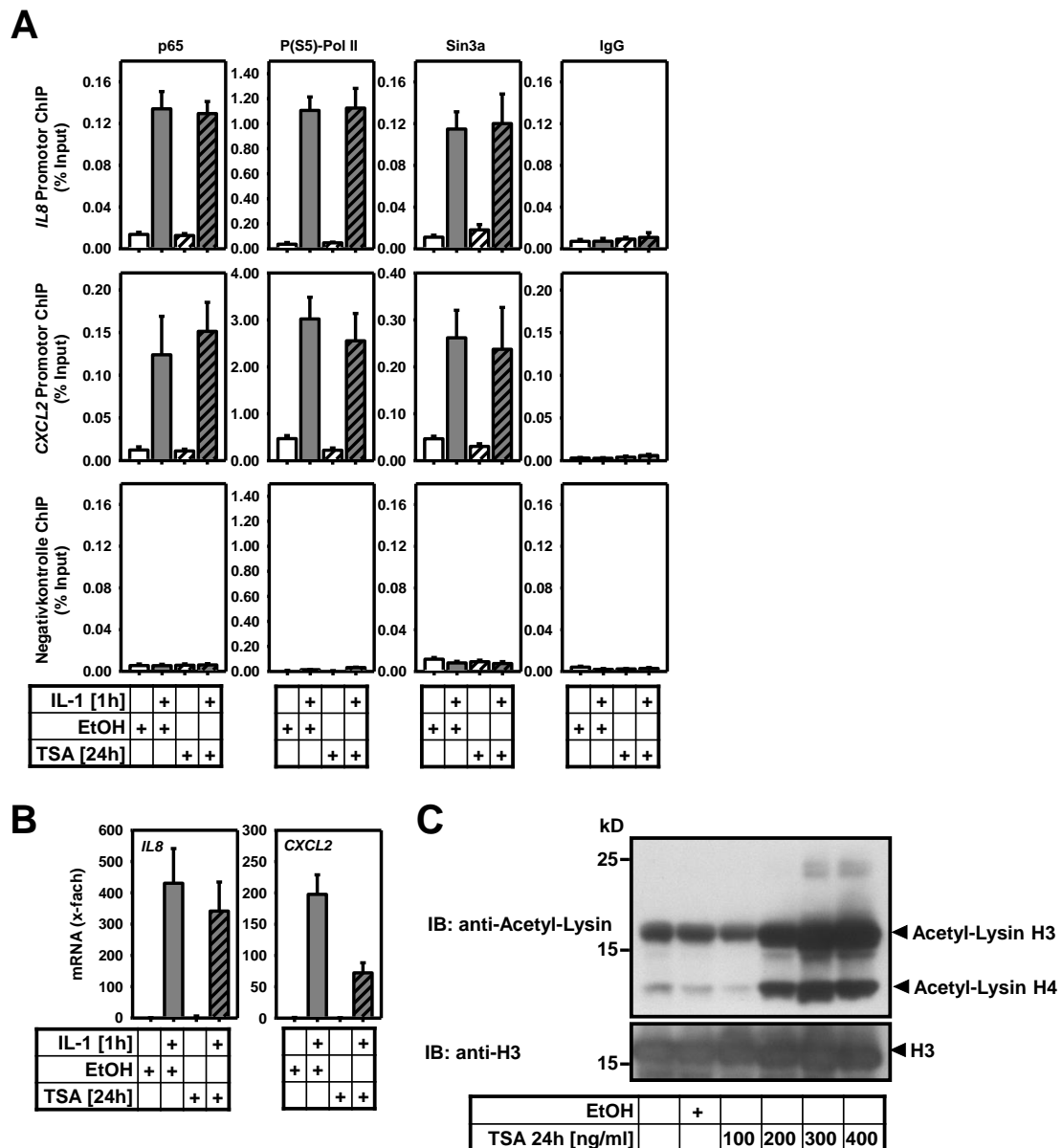


Abbildung 30: Die Hemmung von Klasse I und II HDACs durch TSA beeinflusst die Sin3a Rekrutierung nicht. KB Zellen wurden in der angegebenen Kombination mit Trichostatin A (TSA) [300 ng/ml/ 24 h] bzw. Ethanol [0,03%] vorbehandelt und nachfolgend mit IL-1 α (10 ng/ml/ 1 h) stimuliert (**A-B**). Die Analyse erfolgte über ChIP Experimente und Real-Time PCR. Dabei wurden die Promotoren von *IL8* und *CXCL2*, sowie eine genfreie Region (Negativkontrolle) untersucht (in Abbildung 7 dargestellt). IgG-IPs dienten als Negativkontrolle. Für die jeweiligen Antikörper sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt (**A**). Die Expression der mRNAs wurde mittels RT-qPCR untersucht und die Mittelwerte \pm s.e.m. als x-fache Regulation relativ zur Ethanol-behandelten Kontrolle aus drei unabhängigen Experimenten angegeben (**B**). Die Acetylierung von Histonen wurde mit ansteigender Konzentration an TSA über eine Säure-Extraktion der Histone analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen acetyliertes Lysin im Westernblot. H3 diente dabei als Ladungskontrolle (**C**).

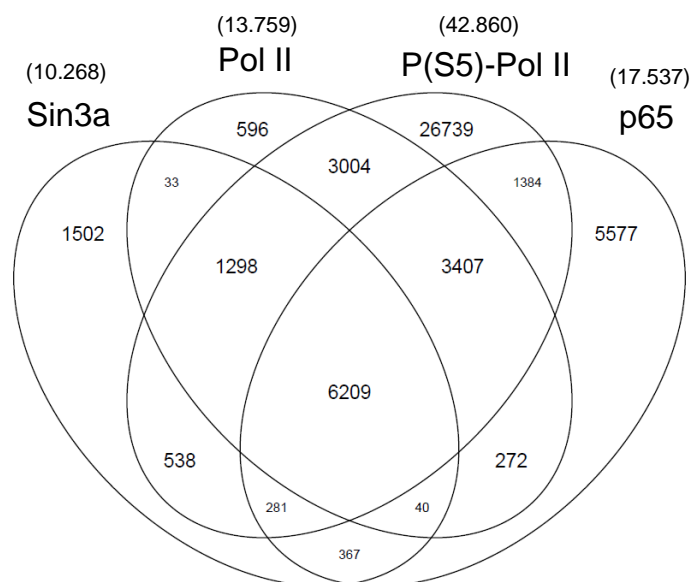
5.3.4 Genomweite Analysen der IL-1-abhängigen Sin3a Chromatinrekrutierung

Nachdem eine IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a an den untersuchten *IL8* und *CXCL2* Promotoren in humanen Zellen validiert werden konnte, wurde die genomweite Rekrutierung in KB Zellen mittels Sequenzierung der ChIP-DNA (ChIP-seq) untersucht.

A

	Anzahl Reads			Anzahl Peaks (macs14)			Anzahl Peaks (ccat)		
	Pol II	P(S5)-Pol II	Sin3a	Pol II	P(S5)-Pol II	Sin3a	Pol II	P(S5)-Pol II	Sin3a
Kontrolle	6502593	21826796	30063614	60125	40260	15318	20225	30560	3032
IL-1	4104577	20966330	27923148	96949	53524	12087	24363	52074	3808
5Z-7-Oxo.	17640233	18832175	34185518	48462	50438	20093	24187	53193	6675
5Z-7-Oxo/IL-1	9257238	25391116	17618225	8314	54123	21902	9250	60900	13123

B



Überlappende Peaks (Sin3a 100%)	
Sin3a/P(S5)-Pol II	81%
Sin3a/Pol II	74%
Sin3a/p65	67%
Sin3a/P(S5)-Pol II/p65	63%
Sin3a/P(S5)-Pol II/p65/Pol II	60%

Abbildung 31: Überblick über die Gesamtzahl an ChIP-seq Reads/Peaks und Anzahl der überlappenden Peaks von Sin3a, Pol II, P(S5)-Pol II und p65. Für Sin3a und P(S5)-Pol II wurden ChIP Experimente durchgeführt. KB Zellen wurden dazu mit dem TAK1-Inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol für 30 min vorinkubiert und mit IL-1 α (10 ng/ml/ 1 h) stimuliert bzw. nicht behandelt. Die ChIP-DNA wurde anschließend mittels Illumina Plattform sequenziert (ChIP-seq). Dargestellt sind die Profile nach bioinformatischer Analyse der Daten durch Dr. Marek Bartkuhn. Als Vergleich sind bereits in der Arbeitsgruppe existierende Profile für p65 und RNA-Pol II gezeigt (Dissertation Liane Jurida). Spezifische Bindungsereignisse (Peaks) für alle Behandlungen wurden über zwei unterschiedliche Algorithmen (Macs14 [Model-based Analysis of ChIP-seq Data] und ccat [Control-based ChIP-seq Analysis Tool]) ermittelt (**A**). Für diejenigen Peaks von Sin3a, Pol II, P(S5)-Pol II und p65, die in mindestens zwei der vier Bedingungen miteinander überlappten, wurde eine Overlap-Analyse (Venn-Diagramm) durchgeführt, wobei ein gemeinsamer Bereich von 1 bp bereits als Überlappung gewertet wurde. Darunter sind die prozentualen Anteile für eine Sin3a-Überlappung angegeben (**B**).

Dabei wurden maximal vier Bedingungen parallel analysiert (unstimulierte Kontrolle, IL-1, 5Z-7-Oxozeaenol, 5Z-7-Oxozeaenol/IL-1) und die Profile von Sin3a und P(S5)-Pol II mit bereits in der Arbeitsgruppe existierenden Profilen von p65 und RNA-Pol II (Dissertation Liane Jurida) verglichen. Die bioinformatischen Analysen wurden von Dr. Marek Bartkuhn durchgeführt und graphisch dargestellt.

Abbildung 31A gibt einen Überblick über die genomweit gemessenen Reads der ChIP-seq Proben und den daraus ermittelten Peaks für Sin3a, P(S5)-Pol II und Pol II. Im Gegensatz zu Pol II und P(S5)-Pol II zeigte sich für Sin3a genomweit eine Erhöhung der Peaks durch die Behandlung mit 5Z-7-Oxozeaenol im Vergleich zur unbehandelten oder IL-1-stimulierten Probe (Abb.31A). Das Venn-Diagramm vergleicht außerdem individuelle und überlappende Peaks der vier Profile miteinander (Abb.31B). Dabei war eine sehr starke Überschneidung zwischen Sin3a und P(S5)-Pol II Peaks zu verzeichnen: 81% der Sin3a Peaks wiesen auch eine Bindung der P(S5)-Pol II auf. 67% der Sin3a Peaks überlappten außerdem mit p65 Peaks. Insgesamt zeigten 60% der Sin3a Peaks auch eine Bindung von Pol II, P(S5)-Pol II und p65 (Abb.31B).

In Abbildung 32 wurden konstitutive Sin3a Peaks mit IL-1-induzierten Sin3a Peaks für alle vier Behandlungen verglichen. Dabei wurden 43788 konstitutive und 957 induzierbare Sin3a Peaks identifiziert (Abb.32A). Während die IL-1 Stimulation bzw. 5Z-7-Oxozeaenol Behandlung keinen Einfluss auf die konstitutiven Peaks besaß, erhöhte sich die Zahl der Sin3a Bindungen nach einer Stimulation mit IL-1 deutlich. Dies wurde durch die Vorbehandlung mit 5Z-7-Oxozeaenol verhindert (Abb.32A). Zusätzlich wurde analysiert, wie stark sich die Peaks dieser beiden Gruppen (konstitutiv vs. IL-1-induzierbar) mit der Bindung von RNA-Pol II und P(S5)-Pol II überschneiden (Abb.32B). Während für RNA-Pol II nur eine ähnliche Tendenz der Effekte zu erkennen war, wies P(S5)-Pol II eine starke Überschneidung mit Sin3a an IL-1-induzierbaren Peaks auf. Auch hier war eine Zunahme mit IL-1 und eine Hemmung durch 5Z-7-Oxozeaenol zu detektieren (Abb.32B).

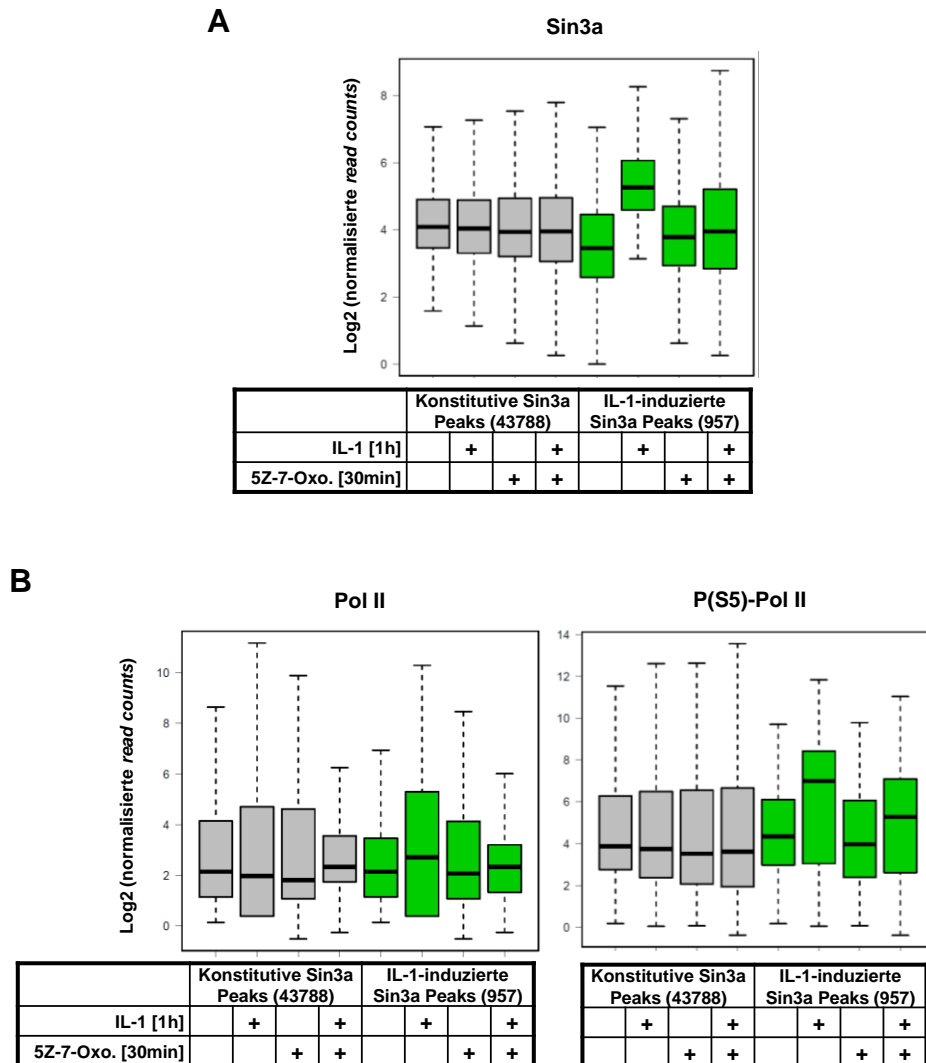


Abbildung 32: Identifizierung einer Gruppe an IL-1-regulierten Sin3a Peaks. ChIP-seq Daten wurden verwendet, um die differentielle Regulation zwischen konstitutiven (graue Boxen; 43788 Peaks) und einer Gruppe an IL-1-induzierten (grüne Boxen; 957 Peaks) Sin3a Bindungsereignissen anhand der normalisierten *read counts* zu kalkulieren (**A**). Zusätzlich wurden alle ChIP-seq Signale für Pol II und P(S5)-Pol II über den Bereichen der konstitutiven bzw. IL-1-induzierbaren Sin3a Peaks ermittelt und analog als Boxplots dargestellt.

Des Weiteren wurde analysiert, an welchen genomischen Elementen (TSS *transcriptional start site*, *upstream* vom TSS, Intron, Exon, TES *transcriptional end site*, intergenisch) eine Bindung von Sin3a im Vergleich zur normalen Verteilung dieser Elemente im Genom auftritt (Abb.33). Auch hier wurden konstitutive Sin3a Bindungen mit IL-1-induzierten Sin3a Bindungen verglichen. Dabei wiesen beide Bindungsgruppen eine verstärkte Anreicherung von Sin3a an TSSs, Exons, TESs und *upstream* von TSSs auf, während eine verminderte Bindung an Introns und in genfreien Bereichen (intergenisch) im Vergleich zur genomischen Verteilung vorlag (Abb.33).

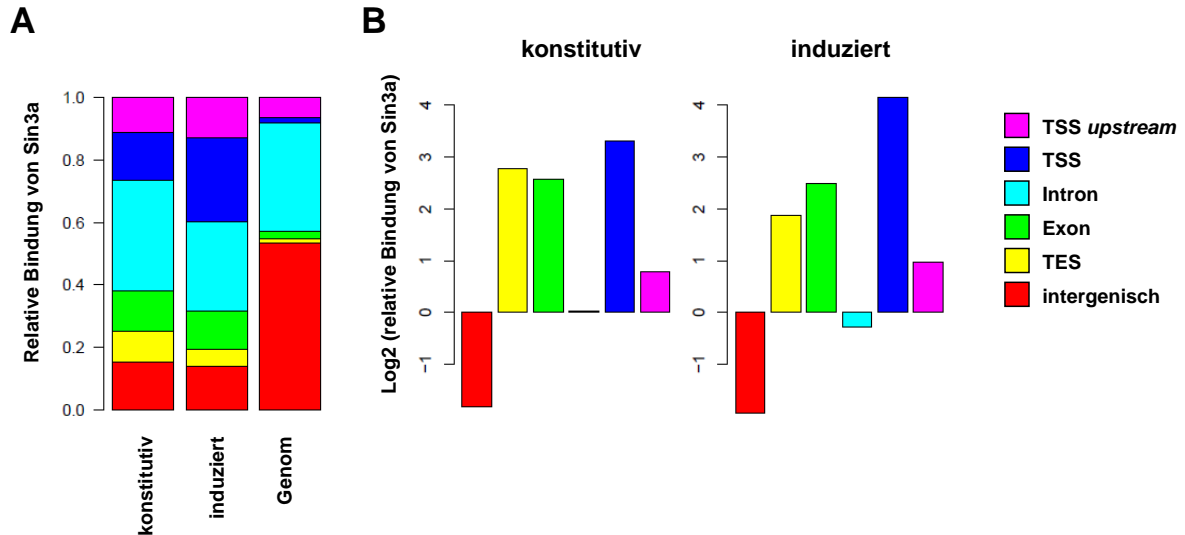


Abbildung 33: Verteilung genomischer Elemente über Regionen mit signifikanter konstitutiver vs. IL-1-induzierter Sin3a Bindung. Dargestellt ist die gemessene Verteilung der konstitutiven (43788) und IL-1-induzierten (957) Sin3a Peaks im Vergleich zu der normalerweise vorhandenen Verteilung der Elemente (TSS *transcriptional start site*, TSS *upstream*, Intron, Exon, TES *transcriptional end site* und intergenisch) im Genom (**A**). Darstellung als Anreicherung von Sin3a relativ zur Frequenz dieser Elemente im Genom (**B**).

In Abbildung 34 ist die durchschnittliche Verteilung der Sin3a, Pol II und P(S5)-Pol II Bindungen aller vier Behandlungen über den Genen und ihren *upstream/downstream* Bereichen dargestellt. Dabei wurden alle RefSeq-annotierten Gene mit einer Gruppe von 189 IL-1-induzierten Genen verglichen.

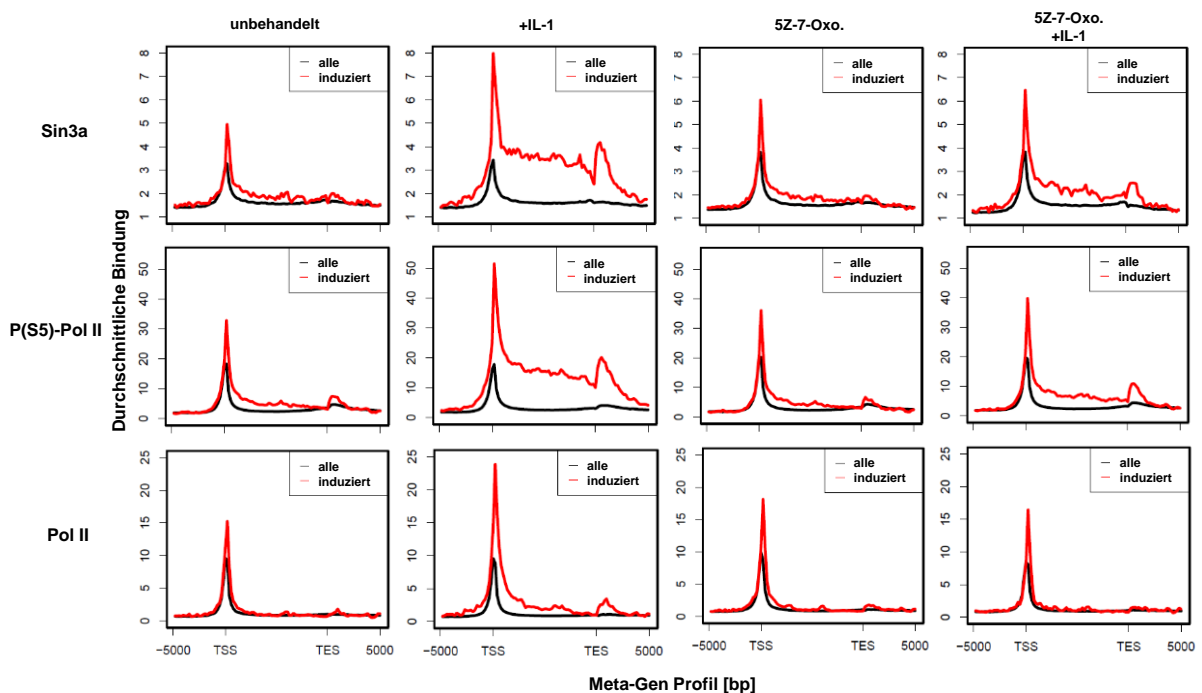


Abbildung 34: Durchschnittliche Verteilung der Sin3a Bindung über den genomischen Regionen der in KB Zellen exprimierten Gene. Meta-Gen Profile für Sin3a ChIP-seq Daten unter den 4 verschiedenen Behandlungsbedingungen. Für jedes Gen wurde der *upstream* (-5000 bp) und *downstream* (+5000 bp) Bereich in 50x100 bp *bins* aufgeteilt und für jedes *bin* die *coverage* berechnet. Ebenso wurde jeder Genkörper in 50 *bins*, mit je nach Genlänge variabler Größe, zerlegt und die *coverage* berechnet. Graphisch dargestellt ist die durchschnittliche *coverage* von Sin3a je *bin* über alle in einer Gruppe befindlichen Gene. Dabei wurden alle RefSeq-annotierten Gene mit 189 IL-1-induzierten Genen verglichen.

Während die Verteilung der Bindungsereignisse für alle drei Faktoren für die Gesamtheit der Gene unter allen vier Behandlungen nahezu unverändert war, zeigten die IL-1-induzierten Gene im basalen Zustand eine etwas erhöhte Bindung der drei Faktoren an den TSSs. Diese Bindungen wurden durch IL-1 deutlich verstärkt und durch die Vorbehandlung mit 5Z-7-Oxozeaenol gehemmt. Gleichzeitig wurden die Bindungen von Sin3a und P(S5)-Pol II über den gesamten Genkörpern und an den TESs ebenfalls durch IL-1 verstärkt und durch eine 5Z-7-Oxozeaenol Vorbehandlung gehemmt. Dabei ähnelten sich vor allem die Profile von Sin3a und P(S5)-Pol II (Abb.34).

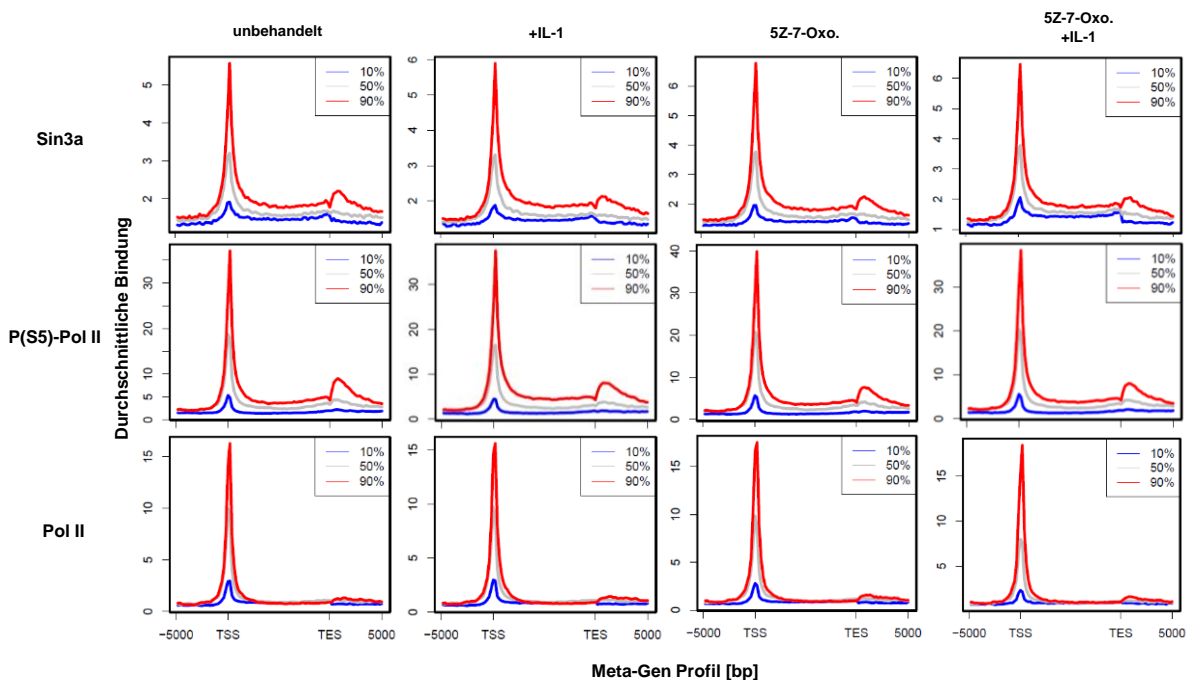


Abbildung 35: Korrelation der relativen Chromatinbindung von Sin3a, P(S5)-Pol II und Pol II mit der mRNA Expression. Meta-Gen Profile für Sin3a, P(S5)-Pol II und Pol II ChIP-seq Daten unter 4 verschiedenen Behandlungsbedingungen. Alle RefSeq-annotierten Gene wurden anhand ihrer FPKM-Werte (*fragments per kilobase of exon per million fragments mapped reads*) sortiert und nach ihrer relativen Expressionstärke in 10 gleich große Gruppen eingeteilt. Die Expressionslevel der Gene in den Gruppen mit 10, 50 und 90%iger Expressionstärke wurden gemittelt und die durchschnittliche *coverage* für diese Gengruppen wie in Abb.34 beschrieben graphisch dargestellt.

Parallel wurde diese Art der Darstellung verwendet, um die Korrelation der Bindungsereignisse von Sin3a, Pol II und P(S5)-Pol II mit der Stärke der Genexpression darzustellen (Abb.35). Unabhängig von der Behandlung der Zellen zeigten alle drei untersuchten Faktoren genomweit eine verstärkte Bindung mit zunehmender Expression der Gene. Dabei wiesen Sin3a und P(S5)-Pol II erneut ein sehr ähnliches Profil auf, wobei auch über den Genkörpern und TESs mit steigender Expression eine verstärkte Bindung auftrat (Abb.35). Durch einen Vergleich der Sin3a ChIP-seq Daten mit bereits in der Arbeitsgruppe Kracht existierenden RNA-seq Daten aus identisch behandelten KB Zellen (Dissertation Liane Jurida), konnte eine weitere Korrelationsanalyse in Bezug auf die Sin3a Bindung und die Genexpression in unbehandelten und IL-1-induzierten Zellen durchgeführt werden (Abb.36). Während die Gesamtheit der Sin3a-bindenden Gene durch eine IL-1 Stimulation in ihrer Bindung und Stärke der Expression nicht beeinflusst wurde, zeigten IL-1-induzierte Sin3a-bindende Gene eine Zunahme der Bindung bei steigender Expression. Dazu wurden beispielhaft die prototypischen IL-1 Zielgene *IL8* und *CXCL2* näher betrachtet (Abb.36A). Durch eine separate Darstellung der IL-1-induzierbaren Gene, wird diese Verschiebung nach einer Stimulation mit IL-1 noch deutlicher (Abb.36B).

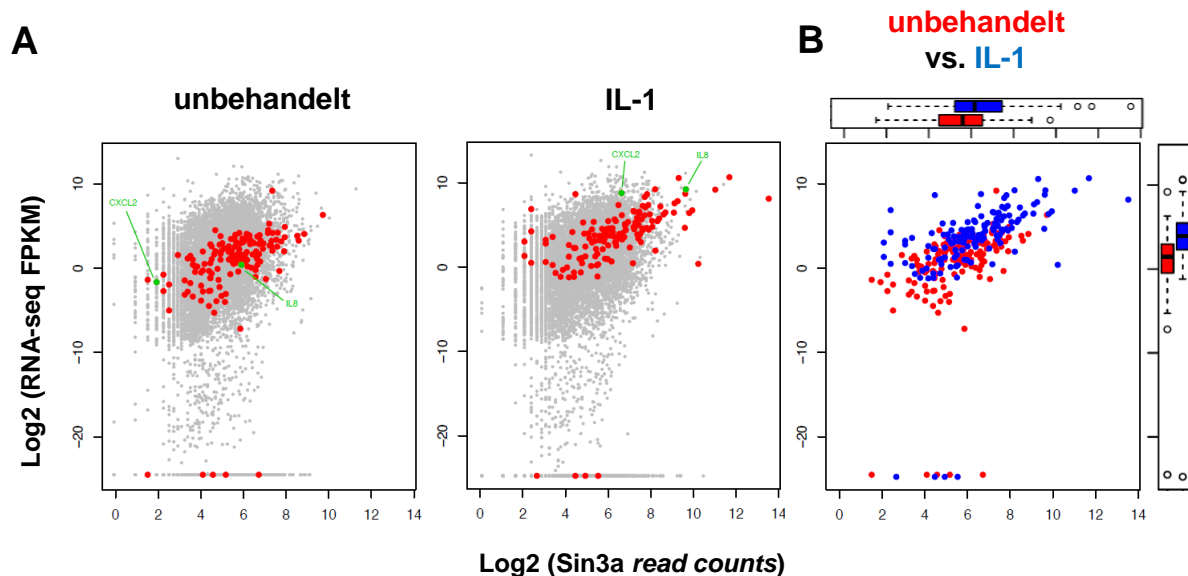
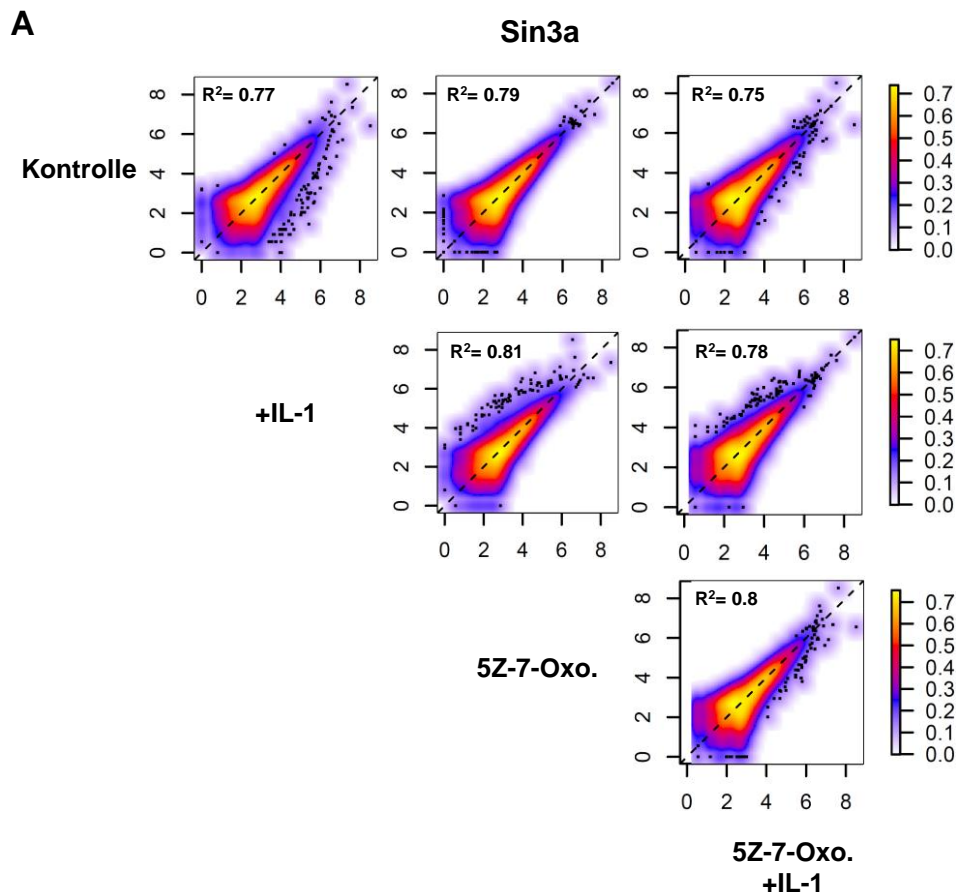


Abbildung 36: Genomweite Korrelationsanalyse von mRNA Expression und Sin3a Bindung. Dargestellt sind Scatter Plots der normalisierten RNA-seq Daten (FPKM) und der Sin3a ChIP-seq Daten (*read counts*) für unbehandelte und IL-1-stimulierte KB Zellen. Jedes XY Paar entspricht dem mRNA-Expressionswert eines Gens und dem dazu gehörigen Sin3a Peak. Die Gesamtheit der Gene ist grau dargestellt, während eine Gruppe an IL-1-induzierten Genen (mit den Modellgenen *IL8* und *CXCL2* in grün) rot hervorgehoben ist (A). Dargestellt ist nur die Gruppe an IL-1-induzierbaren Genen ohne (rot) und mit (blau) IL-1 Behandlung. Die Boxplots geben die Verschiebung der Werte nach der Stimulation mit IL-1 an (B).

Um nun die Effekte der jeweiligen ChIP-seq Proben unter den vier Behandlungen (unstimuliert, +IL-1, 5Z-7-Oxozeaenol, 5Z-7-Oxozeaenol +IL-1) miteinander zu vergleichen, wurden paarweise Korrelationsanalysen durchgeführt (Abb.37). Dabei wiesen alle Scatter-Plots der drei untersuchten Faktoren eine hohe Korrelation der verglichenen Werte auf ($R^2 \geq 0,75$). Vor allem für Sin3a und P(S5)-Pol II setzten sich IL-1 induzierte „Ausreißer“ von der Gesamtheit der Gene ab, die durch die Vorbehandlung mit 5Z-7-Oxozeaenol gehemmt wurden (Abb.37A, 37B). Für Pol II trat die IL-1-spezifische Verteilung dieser „Ausreißer“ deutlich geringer auf und auch die Hemmung durch 5Z-7-Oxozeaenol war nur partiell zu beobachten (Abb.37C).



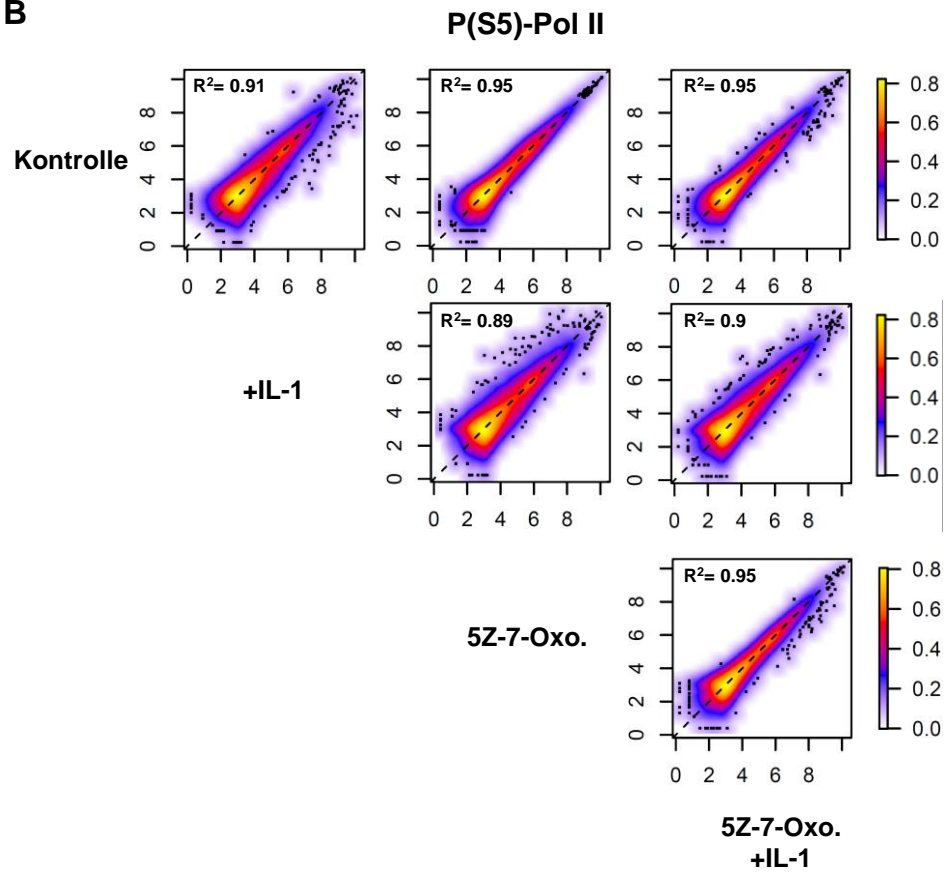
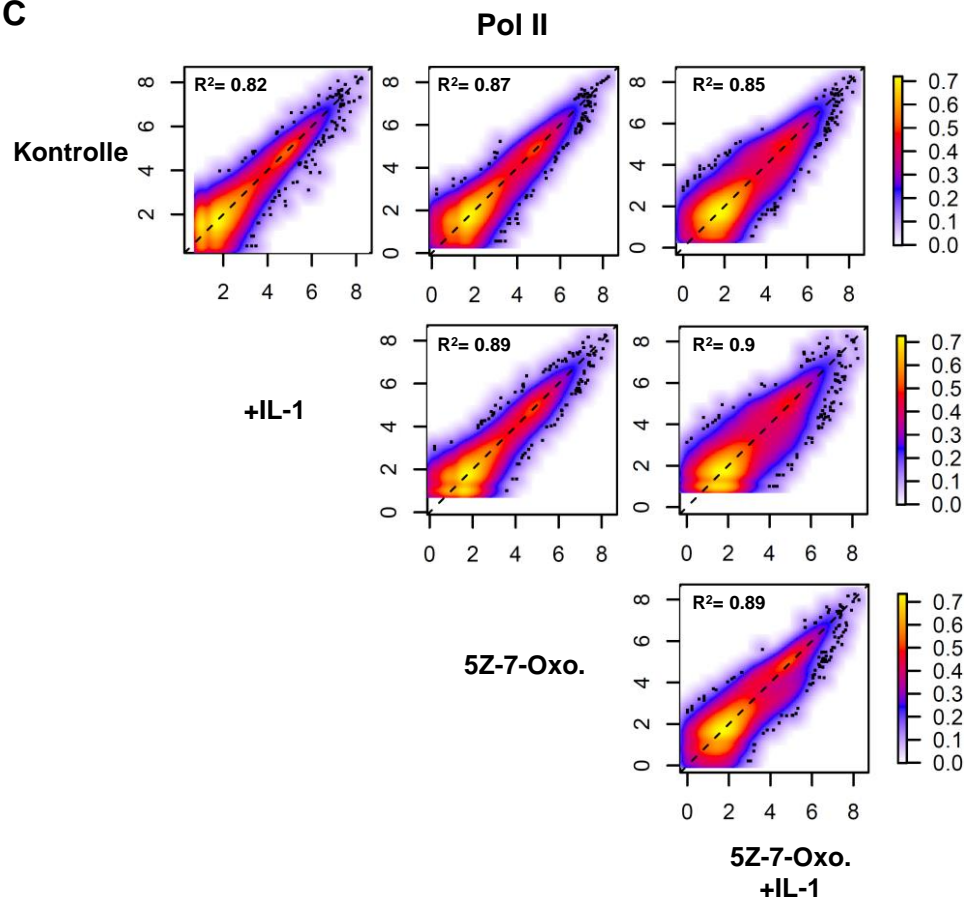
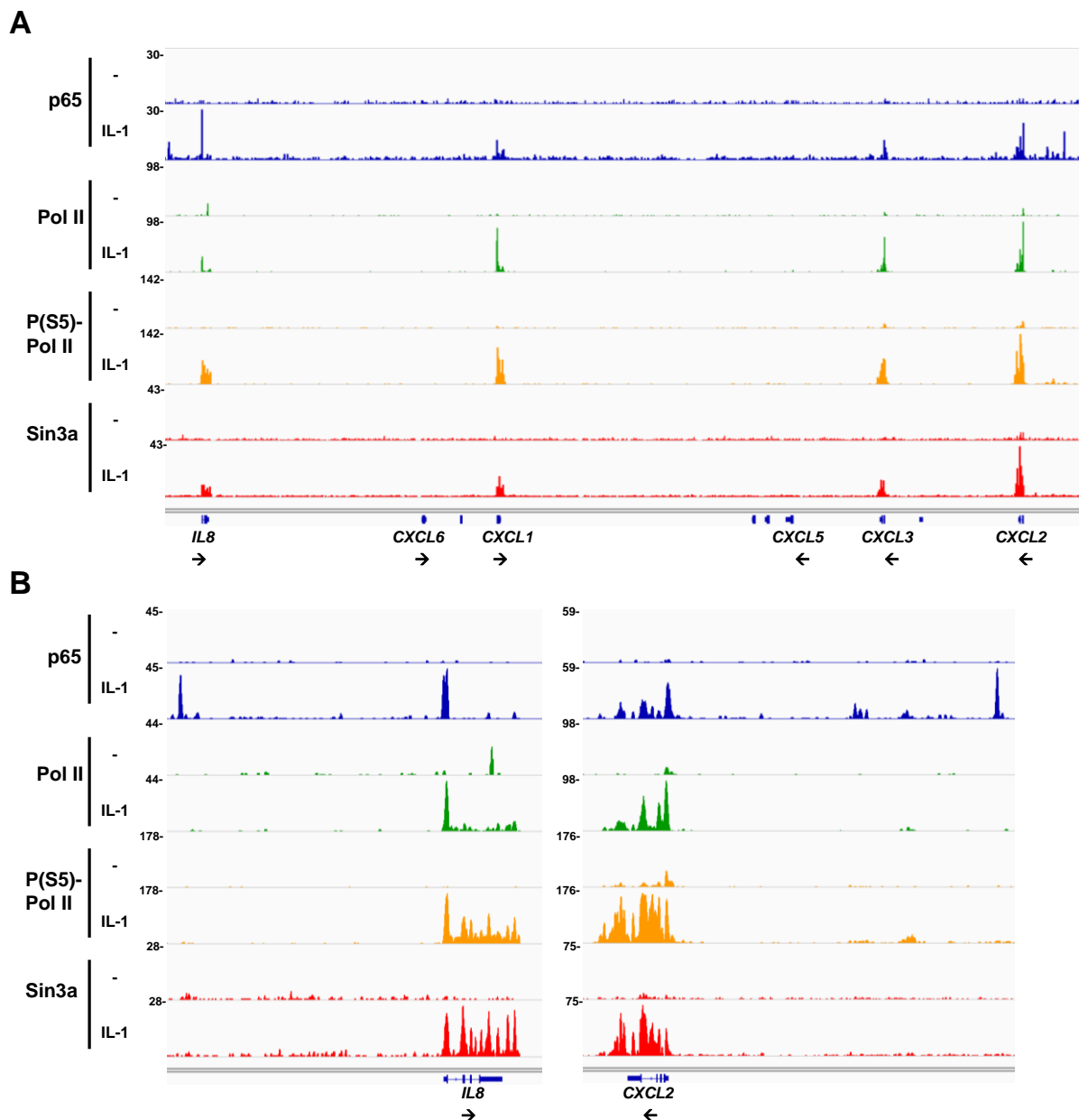
B**C**

Abbildung 37: Korrelationsanalyse aller Quartil-normalisierten *read counts* für Sin3a, P(S5)-Pol II und Pol II unter den vier Behandlungsbedingungen. Dargestellt sind die Quartil-normalisierten *read counts* für die Union aller Peaks im paarweisen Vergleich zwischen den vier Behandlungsbedingungen (unstimuliert/Kontrolle, +IL-1, 5Z-7-Oxozeaenol und 5Z-7-Oxozeaenol +IL-1) als Scatter-Plots für Sin3a (A), P(S5)-Pol II (B) und Pol II (C). Je näher die Messwerte entlang der Ursprungsgeraden verlaufen, desto höher die Korrelation der Daten (angegeben als durchschnittlicher Pearson's Korrelationskoeffizient R^2). Schwarze Dots stellen „Ausreißer“ dar, die durch die Stimulation mit IL-1 bzw. durch die Behandlung mit 5Z-7-Oxozeaenol hervorgerufen werden. Die Farbskala gibt dabei die Dichte der Messwerte an.

Anschließend wurden die ChIP-seq Profile für das CXC-Chemokincluster auf Chromosom 4 mit den flankierenden Genen *IL8* und *CXCL2* für unbehandelte und IL-1-stimulierte Zellen näher charakterisiert (Abb.38A, 38B).



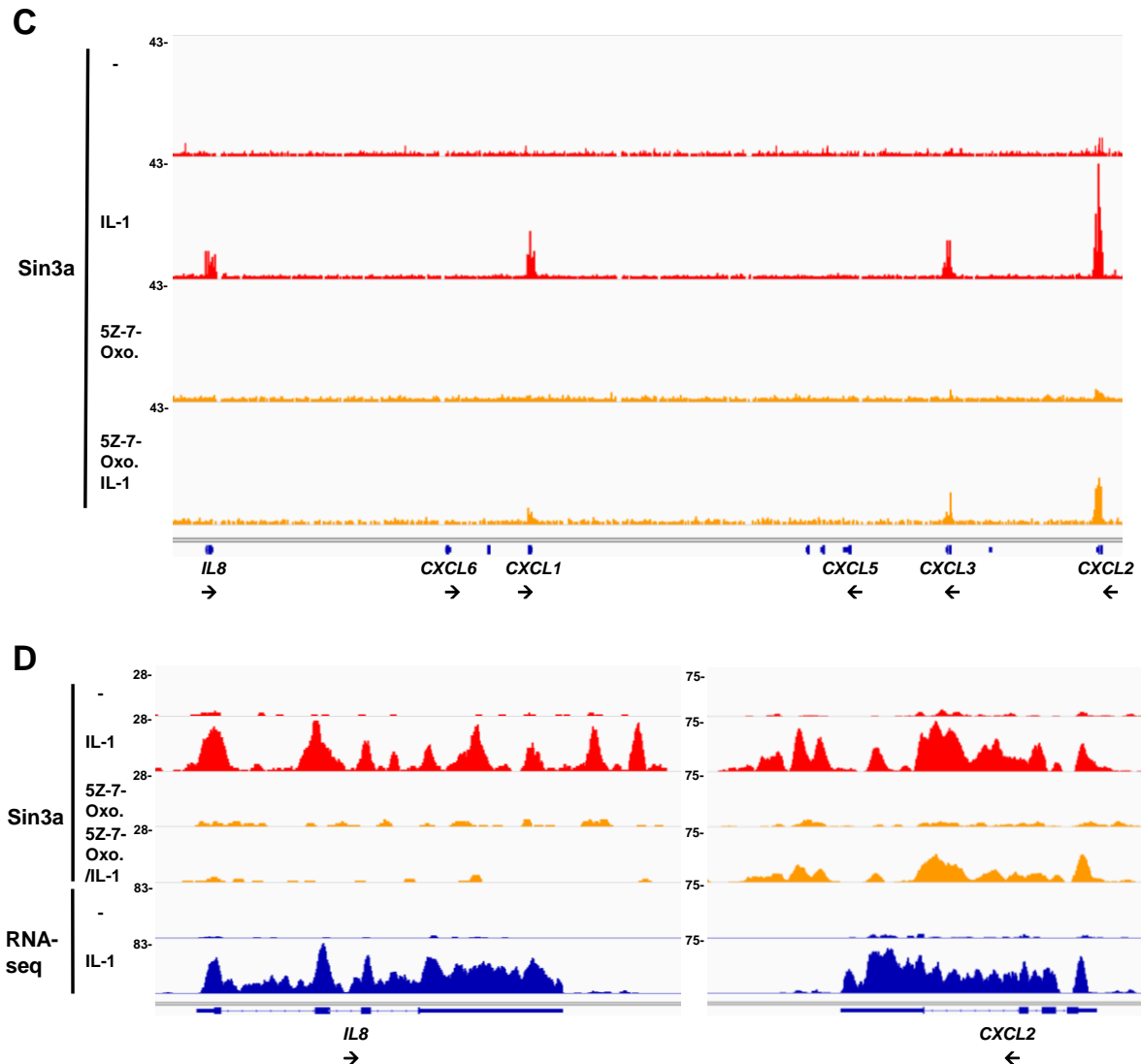


Abbildung 38: ChIP-seq Analyse von Sin3a am CXC-Cluster auf Chromosom 4. Für Sin3a und P(S5)-Pol II wurden ChIP Experimente durchgeführt. KB Zellen wurden dazu mit dem TAK1-Inhibitor 5Z-7-Oxozeanol für 30 min vorinkubiert und mit IL-1 α (10 ng/ml / 1 h) stimuliert bzw. nicht behandelt. Die ChIP-DNA wurde anschließend mittels Illumina Plattform sequenziert (ChIP-seq). Dargestellt sind die Profile nach bioinformatischer Analyse der Daten durch Dr. Marek Bartkuhn im IGV2.3-Viewer. Als Vergleich sind bereits in der Arbeitsgruppe existierende Profile für p65 und RNA-Pol II gezeigt (Dissertation Liane Jurida). Es ist das CXC-Cluster auf Chromosom 4 für unbehandelte und IL-1-stimulierte Proben dargestellt (A), sowie ein Ausschnitt am *IL8* und *CXCL2* Locus (B). Die Sin3a Profile sind für das CXC-Cluster (C), sowie ein Ausschnitt am *IL8* und *CXCL2* Locus im Vergleich zu RNA-seq Profilen von analog behandelten KB Zellen gezeigt (RNA-seq Experimente von Liane Jurida durchgeführt) (D).

Es konnte eine überlappende IL-1-induzierte Bindung von p65, RNA-Pol II, P(S5)-Pol II und Sin3a an allen aktiven Genen des Clusters (*IL8*, *CXCL1*, *CXCL3* und *CXCL2*) detektiert werden. Die beiden flankierenden regulatorischen Enhancer Strukturen von *IL8* und *CXCL2* wiesen dagegen nur eine Bindung von p65 auf (Abb.38A, 38B). Bei näherer Betrachtung der beiden Modellgene fiel auch hier im Vergleich mit den genomweiten Daten auf, dass sich vor

allen die Profile von Sin3a und P(S5)-Pol II sehr ähnlich waren (Abb.38B). Während p65 und RNA-Pol II die stärksten Signale an der Promotorregion aufwiesen, zeigten Sin3a und P(S5)-Pol II starke Signale über das Gen verteilt, die sich weitgehend überlappten. Vergleicht man die Profile für Sin3a unter allen untersuchten Bedingungen, konnte am CXC-Cluster (inklusive *IL8* und *CXCL2*) bestätigt werden, dass die Inhibition von TAK1 durch den Inhibitor 5Z-7-Oxozeaenol zu deutlich verminderten Signalen an allen aktiven Genen führte (Abb.38C, 38D). Vor allem bei der näheren Betrachtung von *IL8* wurde im Vergleich zu RNA-seq Profilen (Dissertation Liane Jurida) deutlich, dass die stärksten Signale für Sin3a nach IL-1 Stimulation über den Exonen lagen (Abb.38D).

Zusammenfassend konnte in Kapitel 5.3 gezeigt werden, dass Sin3a IL-1-abhängig an die Promotoren, nicht aber an die Enhancer von NF- κ B Zielgenen in humanen und murinen Zellsystemen rekrutiert wird (Abb.39). Diese Rekrutierung hängt von den zytoplasmatischen Signalkomponenten TAK1 und IKK ab. Klasse I und II HDACs besitzen dagegen kaum Einfluss auf die Rekrutierungsereignisse am *IL8* und *CXCL2* Promotor. In genomweiten Analysen wurde deutlich, dass die Rekrutierung von Sin3a sich vor allem mit der Bindung der aktiven RNA-Pol II überlagert, sich über den gesamten Genkörper von transkribierten Genen erstreckt und mit der Stärke der Gentranskription korreliert.

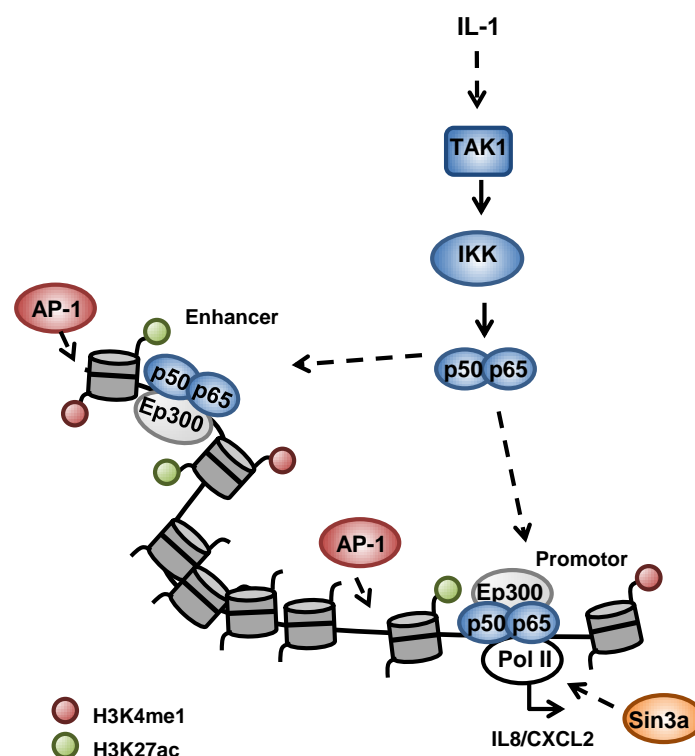


Abbildung 39: Zusammenfassende schematische Darstellung der IL-1-abhängigen Sin3a Rekrutierung an aktivierte NF- κ B Zielgene. Mittels ChIP und ChIP-seq Analysen konnte in dieser Arbeit die IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a an aktivierte NF- κ B Zielgene gezeigt werden. Dabei konzentrierte sich die Lokalisation auf die Promotoren und Exone der Zielgene, während regulatorische Enhancer-Strukturen keine Bindung aufwiesen.

5.4 Untersuchungen zur Interaktion von Sin3a mit NF- κ B p65 und RNA-Polymerase II

In ChIP und ChIP-seq Experimenten zeigte sich, dass Sin3a zusammen mit p65 und RNA-Pol II an IL-1-induzierte Gene rekrutiert wird (Abb.38). Des Weiteren sollte untersucht werden, ob eine direkte Interaktion zwischen diesen Faktoren besteht und welche Hierarchie der Bindungsereignisse vorliegt.

5.4.1 Kinetische Analyse der IL-1-abhängigen Bindungsereignisse an den *IL8* und *CXCL2* Loci

In KB Zellen wurde zunächst eine IL-1 Kinetik der Bindungsereignisse von p65, P(S5)-Pol II und Sin3a am *IL8* und *CXCL2* Promotor erstellt (Abb.40).

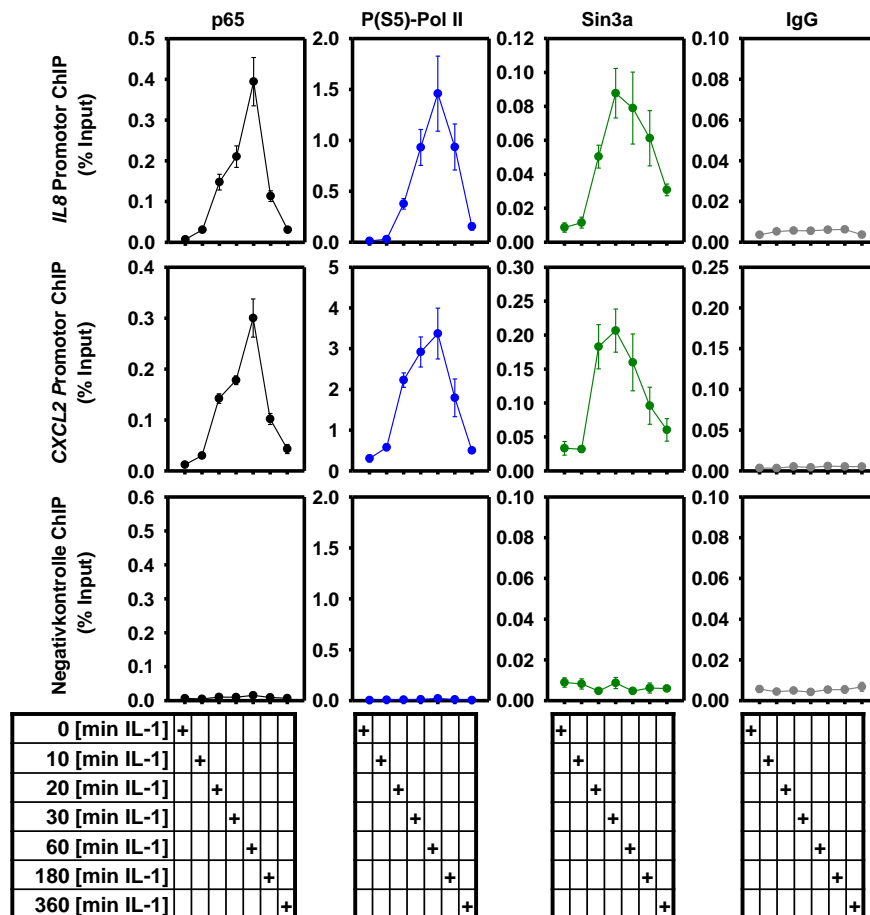
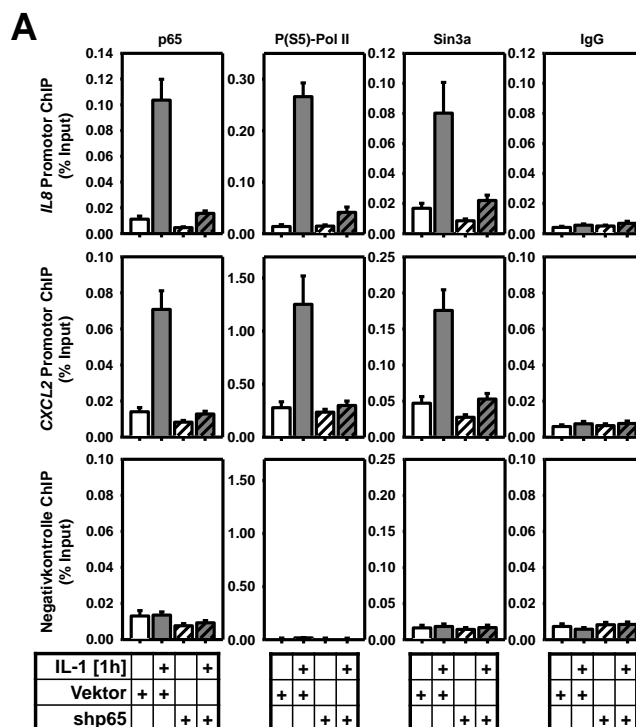


Abbildung 40: Kinetische Analyse der IL-1-induzierten Rekrutierung von p65, P(S5)-Pol II und Sin3a. KB Zellen wurden mit IL-1 α (10 ng/ml) für die angegebenen Zeiten stimuliert und in ChIP Experimenten mit Hilfe der angegebenen Antikörper und Primerpaare (in Abbildung 7 dargestellt) analysiert. IgG-IPs dienen als Negativkontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus mindestens vier unabhängigen Experimenten.

p65 und P(S5)-Pol II zeigten die stärksten Signale nach 1 h IL-1 Stimulation und einen gleichmäßigen Abfall bis zum 6 h Stimulationswert. Dagegen wurde die maximale Sin3a Bindung bereits nach 30 min IL-1 detektiert und zeigte einen langsameren Abfall auf das basale Niveau.

5.4.2 Auswirkungen einer p65 Depletion auf die Sin3a Rekrutierung in humanen HeLa Zellen und murinen embryonalen Fibroblasten

Um die Hierarchie der Bindungsereignisse zu untersuchen, wurde die Rekrutierung von RNA-Pol II und Sin3a in p65-depletierten Zellen untersucht. Dazu wurden ChIPs in p65-*knockdown* HeLa Zellen (Abb.8, 41A) und rekonstituierten p65 Wildtyp (wt) / p65-*knockout* (KO) murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) (Abb.41B-D) durchgeführt. In HeLa Zellen führte die verminderte p65 Proteinmenge wie zuvor beschrieben zu einer deutlichen Reduktion der RNA-Pol II Bindung am *IL8* und *CXCL2* Promotor. Die Rekrutierung von Sin3a war an beiden Loci ebenfalls stark gehemmt (Abb.41A). Die Depletion von p65 hatte jedoch keinen Einfluss auf die Sin3a Proteinmenge (Abb.43C).



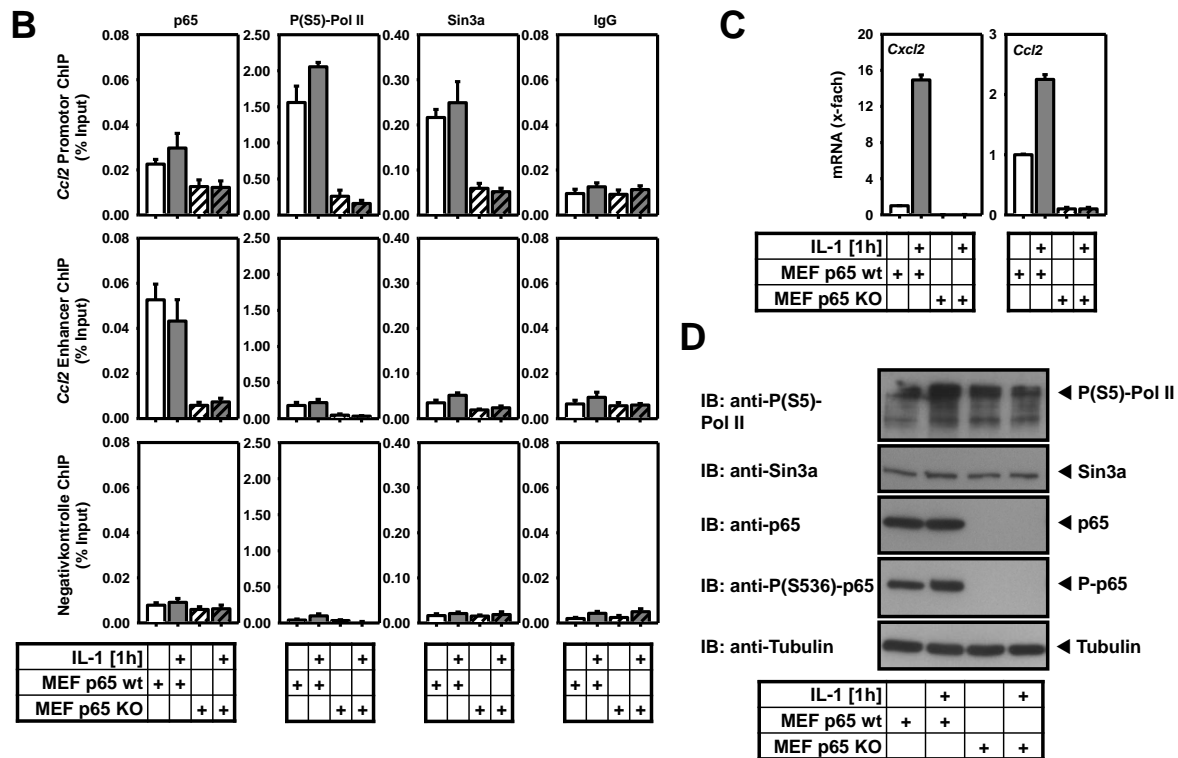


Abbildung 41: p65 ist essentiell für die IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a. HeLa Zellen wurden mit pSuper.puro Kontrollvektor bzw. pSuper.puro-shp65 transfiziert, für 48 h mit 1 µg/ml Puromycin selektiert und mit IL-1α [10 ng/ml] für 1 h stimuliert bzw. nicht behandelt. Die ChIP wurde mit den beschriebenen Antikörpern durchgeführt und mittels Real-Time PCR und den angegebenen Primerpaaren für die *IL8* und *CXCL2* Loci analysiert. IgG-IPs wurden als Negativkontrolle verwendet. Für die jeweiligen Antikörper sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus mindestens sechs, maximal vierzehn unabhängigen Experimenten gezeigt. Der *knockdown* von p65 wurde analog zu Abb.8 überprüft (A). MEF p65 Wildtyp (wt) rekonstituierte bzw. *knockout* (KO) Zellen wurden für 1 h mit IL-1α [10 ng/ml] stimuliert oder nicht behandelt. Die ChIP wurde mit den beschriebenen Antikörpern durchgeführt und mittels Real-Time PCR und den angegebenen Primerpaaren für den *mCcl2* Locus und eine Negativkontrollregion analysiert. IgG-IPs wurden als Negativkontrolle verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus mindestens zwei, maximal vier unabhängigen Experimenten (B). Die Expression von *mCxcl2* und *mCcl2* wurde mittels RT-qPCR quantifiziert und die Mittelwerte \pm s.e.m als x-fache Regulation aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt (C). Die Proteinmengen für die angegebenen Proteine wurden im Westernblot analysiert. Tubulin diente als Ladungskontrolle (D).

Ein *knockout* von p65 in MEFs beeinflusste die Proteinmengen von Sin3a und P(S5)-Pol II ebenfalls nicht (Abb.41D). Auf Ebene des Chromatins konnte bereits in p65-rekonstituierten MEFs eine basale Bindung von p65 am *mCcl2* Enhancer bzw. von P(S5)-Pol II und Sin3a am *mCcl2* Promotor detektiert werden (Abb.41B). Diese Bindungsereignisse waren in p65-*knockout* Zellen vollständig gehemmt (Abb.41B) und die p65 Zielgene *mCxcl2* und *mCcl2* wurden kaum mehr exprimiert (Abb.41C). Eine p65-Depletion in beiden Zellsystemen zeigte, dass die p65 Bindung essentiell für die Rekrutierung von RNA-Pol II und Sin3a ist.

Um die weitere Hierarchie der Rekrutierungsereignisse von RNA-Pol II und Sin3a zu untersuchen, wurden drei Arbeitshypothesen erstellt (Abb.42). p65 als Masterregulator könnte die Rekrutierung der RNA-Polymerase II bewirken, welche wiederum für die Sin3a Rekrutierung notwendig wäre (Modell 1). Im umgekehrten Fall könnte p65 die Sin3a Rekrutierung bewirken, was wiederum zur Anlagerung der Polymerase führt (Modell 2). Es wäre jedoch auch eine Ko-Rekrutierung von RNA-Pol II und Sin3a denkbar (Modell 3). Um die drei Modelle zu überprüfen, wurden im Folgenden weitere „*loss/gain-of-function*“ und pharmakologische Ansätze angewandt.

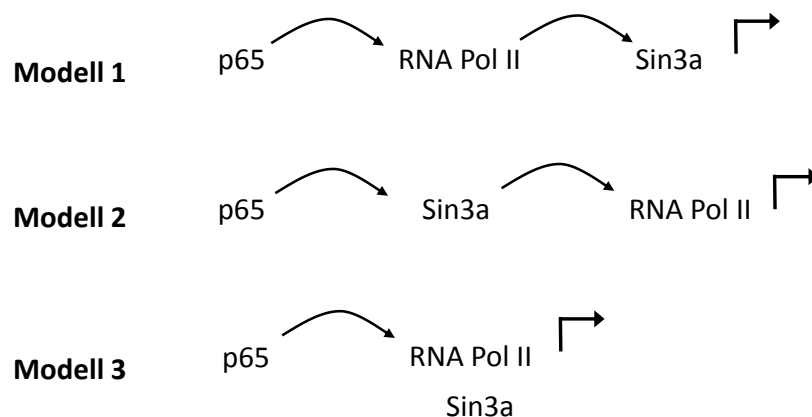


Abbildung 42: Schematische Darstellung von drei Arbeitsmodellen zur Hierarchie der Rekrutierungsereignisse an IL-1-induzierten NF-κB Zielgenen. Mittels „*loss-of-function*“ Ansatz konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von RNA-Pol II und Sin3a von der p65 Bindung abhängig ist. Die weitere Hierarchie der Rekrutierungsereignisse war noch ungeklärt und sollte im Folgenden durch „*loss/gain-of-function*“ und pharmakologische Ansätze näher charakterisiert werden.

5.4.3 Analyse der IL-1-induzierbaren Bindung von p65 und RNA-Pol II in humanen Sin3a-*knockdown* Zellen

Neben der p65-Depletion wurde auch die shRNA-vermittelte Verminderung der Sin3a Proteinmenge und deren Einfluss auf die Bindungsereignisse von p65 und RNA-Pol II untersucht. Dazu wurde eine gegen Sin3a gerichtete shRNA Sequenz in den pSuper.puro Vektor kloniert. Transient transfizierte HeLa-Zellen wurden für 48 h mit Puromycin selektiert, um eine möglichst starke Defizienz zu gewährleisten. Eine längere Selektion der Sin3a-*knockdown* Zellen führte zu vermehrtem Zellsterben. Daher war es nicht möglich eine stabile Zelllinie zu etablieren (Daten nicht gezeigt). Die verbleibende mRNA und Proteinmenge konnte durch RT-qPCRs und Westernblot quantifiziert werden (Abb.43B, C, D). Im Westernblot war keine gegenseitige Beeinflussung von p65 und Sin3a im jeweiligen *knockdown* zu detektieren (Abb.43C). Im Gegensatz zum sehr effektiven p65-*knockdown*, war der Sin3a-*knockdown* nur partiell. Es wurden weitere shRNA Sequenzen gegen Sin3a

gerichtet kloniert, welche die *knockdown*-Effizienz jedoch nicht steigerten (Daten nicht gezeigt). Auf mRNA Ebene konnte mittels RT-qPCR eine 40-60%ige Reduktion von *Sin3a* je nach Transfektion nachgewiesen werden (Abb.43B, D). Der *knockdown* führte zu einer gesteigerten Expression von *IL8* und *CXCL2*. In einer IL-1 Kinetik konnte gezeigt werden, dass die De-Regulation auf das basale Level zu späteren Zeitpunkten verschoben war (Abb.43D). Auf Chromatin-Ebene war ebenfalls eine ca. 50%ige Abnahme der Sin3a Rekrutierung am *IL8* und *CXCL2* Promotor detektierbar (Abb.43A). Die Bindung von p65 und P(S5)-Pol II war in diesen Sin3a-depletierten Zellen jedoch nur wenig beeinflusst.

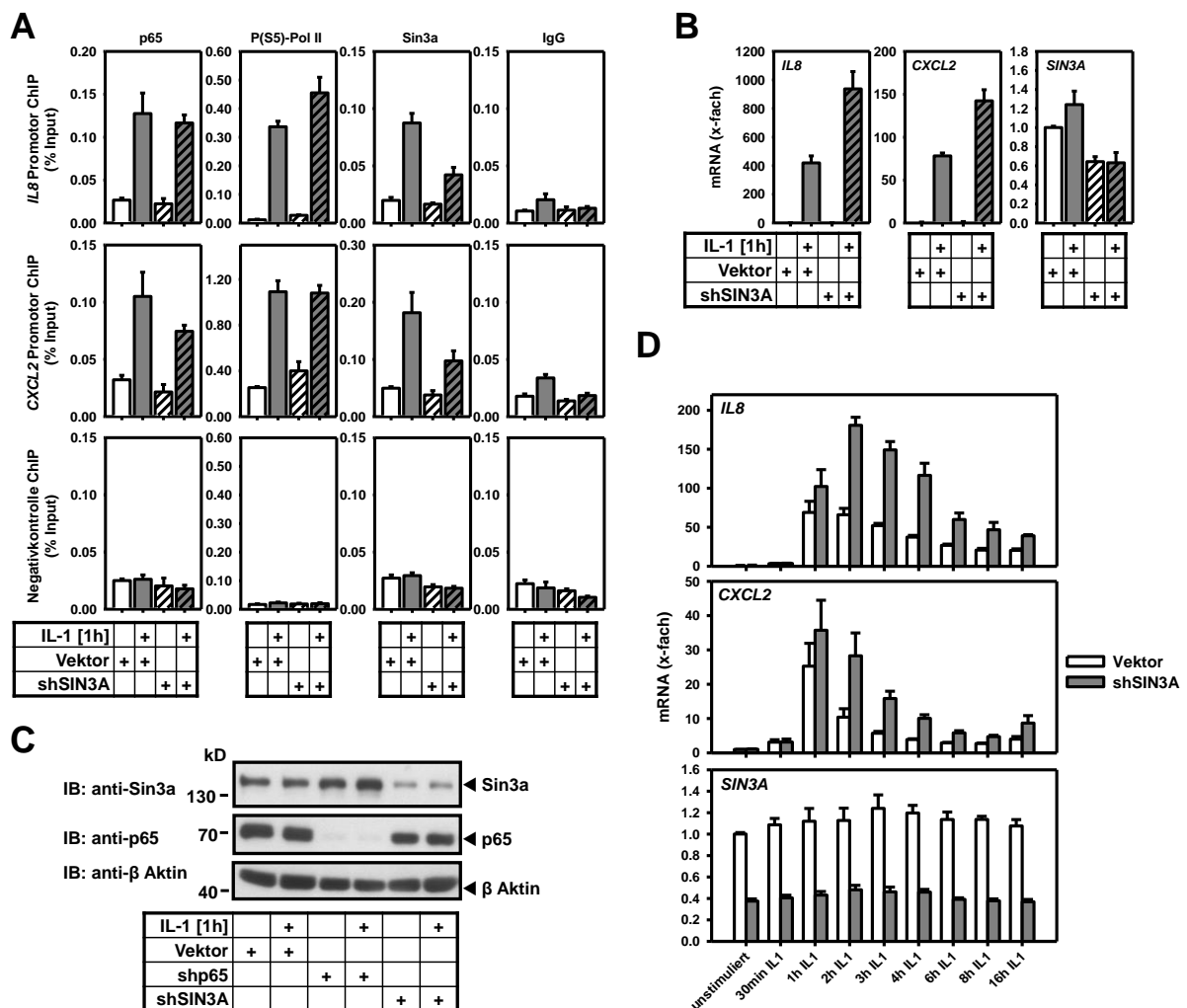


Abbildung 43: Sin3a reprimiert die Expression der IL-1 Zielgene *IL8* und *CXCL2*. HeLa Zellen wurden mit pSuper.puro Kontrollvektor bzw. pSuper.puro-shSin3a transfiziert, für 48 h mit 1 µg/ml Puromycin selektiert und mit IL-1α [10 ng/ml] für 1 h stimuliert bzw. nicht behandelt. Die ChIP wurde mit den beschriebenen Antikörpern durchgeführt und mittels Real-Time PCR und den angegebenen Primerpaaren für die *IL8* und *CXCL2* Loci analysiert. IgG-IPs wurden als Negativkontrolle verwendet. Für die jeweiligen Antikörper sind die Mittelwerte \pm s.e.m [% Input] aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten gezeigt (**A**). Die Expression der mRNA für *IL8*, *CXCL2* und *Sin3a* wurde mittels RT-PCR quantifiziert und die Mittelwerte \pm s.e.m. als x-fache Regulation aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt (**B**). Die Proteinexpression von Sin3a und p65 in Sin3a- und p65-defizienten HeLa Zellen wurde im Westernblot untersucht. β -Aktin diente als Ladungskontrolle (**C**). Der Verlauf der mRNA Expression von *IL8*, *CXCL2* und *Sin3a* wurde nach den angegebenen IL-

1 α (10 ng/ml) Stimulationszeiten durch RT-qPCR Experimente analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. als x-fache Regulation aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (D).

5.4.4 Untersuchung der Bindungs-Abhängigkeiten mittels „gain-of-function“ Ansätzen

Zur weiteren Untersuchung von Bindungsereignissen wurde der Einfluss einer Überexpression von p65 bzw. Sin3a näher untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die exogene Expression von HA-p65 in HeLa Zellen schon in unstimulierten Zellen zu einer gesteigerten Bindung von p65, P(S5)-Pol II und Sin3a führte (Abb.44).

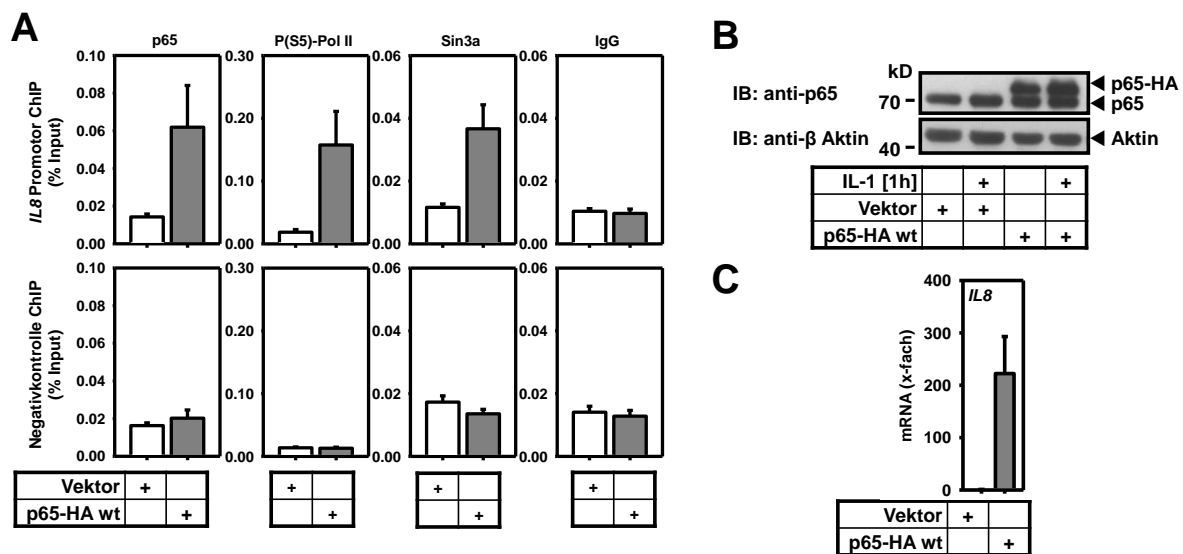


Abbildung 44: Die Überexpression von p65 führt zu einer gesteigerten Rekrutierung von Sin3a. HeLa Zellen wurden mit pEBB-HA Kontrollvektor bzw. pEBB-HA-p65 wt transient transfiziert. Die Analyse erfolgte in der ChIP und Real-Time PCR mit den angegebenen Antikörpern und Primerpaaren für den *IL8* Locus. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (A). HeLa Zellen wurden wie in (A) beschrieben transfiziert und 24 h nach der Transfektion für 1 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Proteinmengen wurden im Westernblot analysiert. β -Aktin diente als Ladungskontrolle (B). Abbildung modifiziert nach [100]. Die mRNA Expression von *IL8* wurde aus analogen Experimenten zu (A) und (B) von Dr. Katja Handschick analysiert (C).

Die Überexpression von Sin3a-MYC zeigte eine leichte Reduktion der Expression von *IL8* und *CXCL2* (Abb.45B). Parallel zu ChIP- (Abb.45A) und „Half-Way“ ChIP-Experimenten (Abb.53) aus einer Chromatin-Präparation, wurden die Chromatin-Lysate im Westernblot analysiert (Abb.45C). Hier zeigte sich eine Verminderung der RNA-Pol II Signale in Sin3a-überexprimierenden Zellen, während die p65 Proteinmenge nicht beeinflusst war. In ChIP Experimenten war die p65 Bindung ebenfalls kaum verändert, während die P(S5)-Pol II, trotz gehemmter Expression, eine leicht gesteigerte Bindung zeigte. Die Überexpression von

Sin3a führte jedoch zu keiner vermehrten Rekrutierung von Sin3a selbst am Chromatin (Abb.45A).

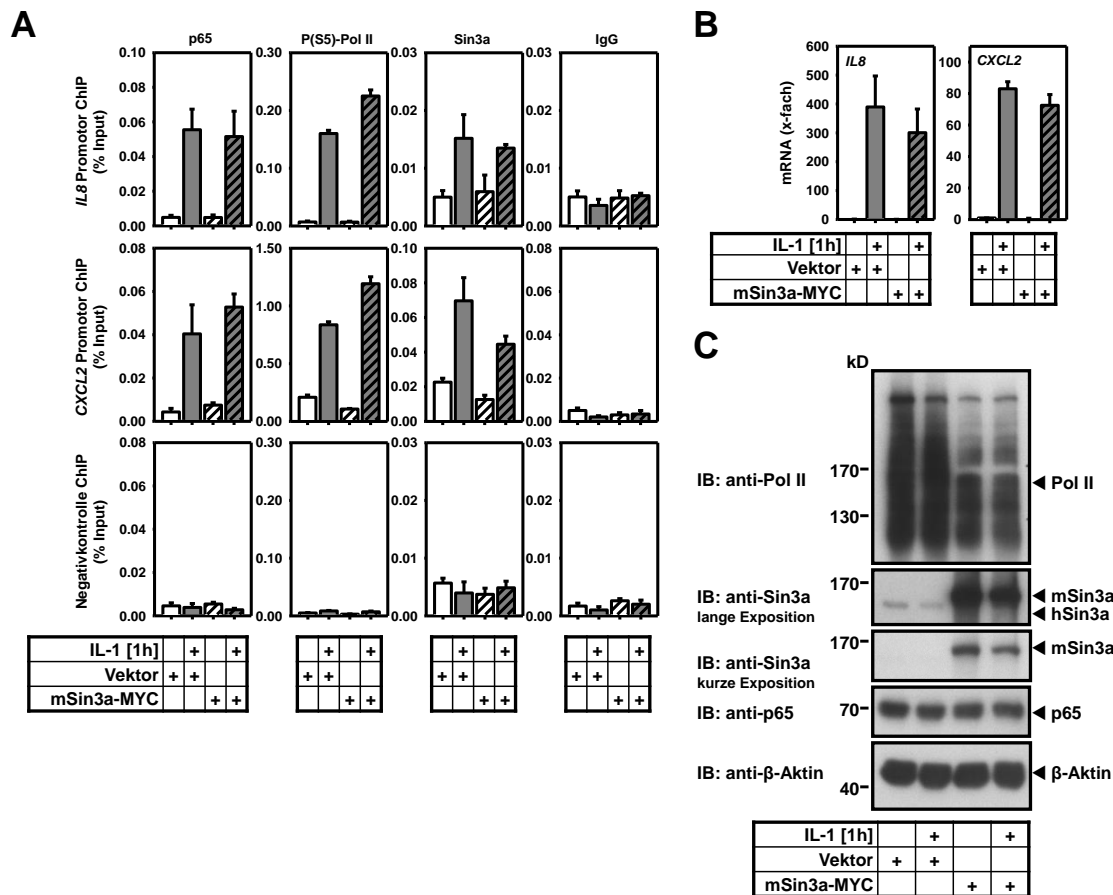


Abbildung 45: Die Überexpression von Sin3a besitzt kaum Einfluss auf die Rekrutierungsereignisse und die IL-1-abhängige Genexpression von *IL8* und *CXCL2*. HeLa Zellen wurden mit pCS2+MT MYC Kontrollvektor bzw. pCS2+MT mSin3a-MYC transient transfiziert. Die Analyse erfolgte in der ChIP und Real-Time PCR mit den angegebenen Antikörpern und Primerpaaren für die *IL8* und *CXCL2* Loci. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus zwei unabhängigen Experimenten (A). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde mittels RT-qPCR analysiert. Es sind die Mittelwerte \pm s.e.m. als x-fache Regulation aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt (B). Die Proteinmengen im ChIP-Lysat wurden im Westerblot überprüft („Half-Way“ ChIP) (C).

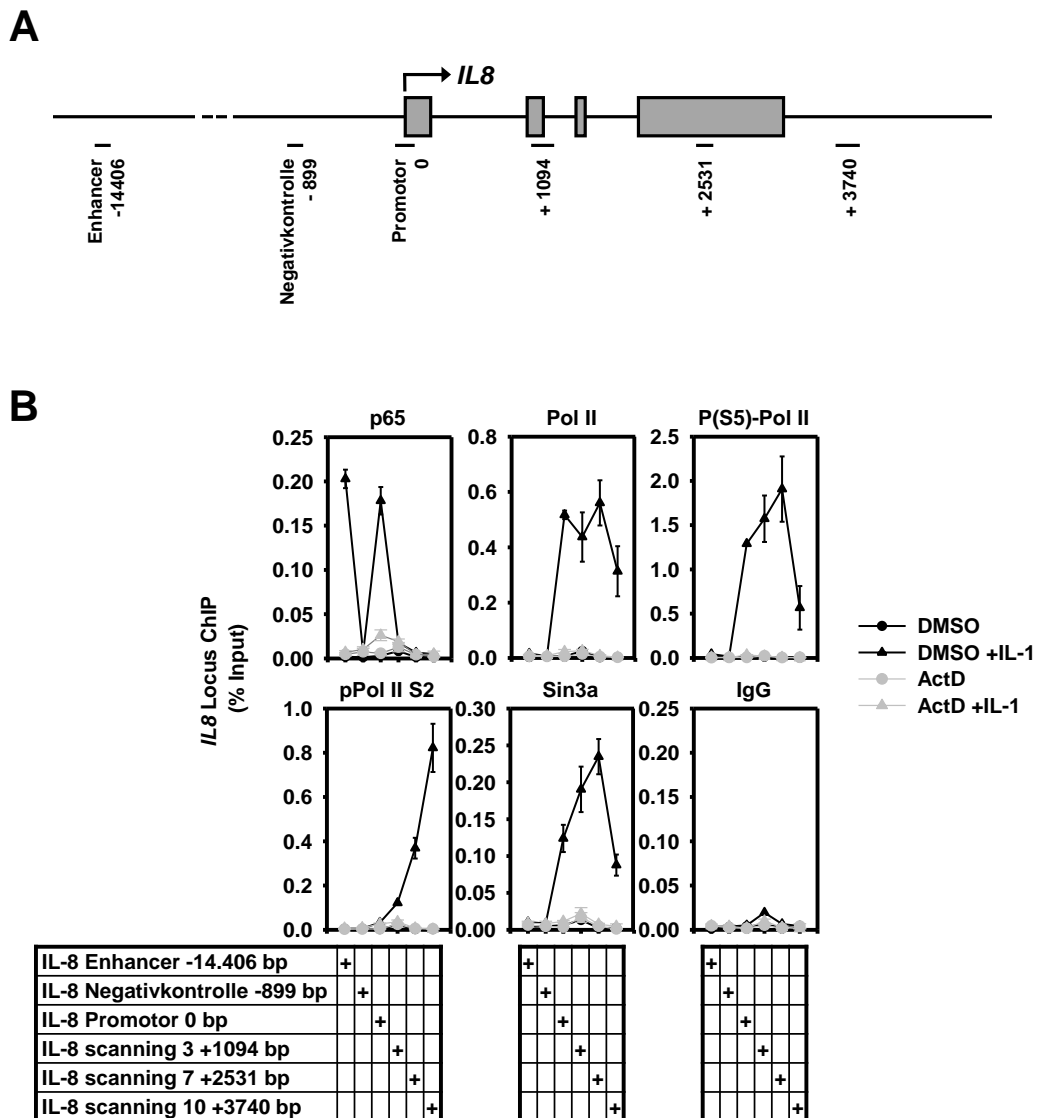
5.4.5 Einfluss der RNA-Pol II Aktivität auf die Rekrutierung von p65 und Sin3a

Wie bereits beschrieben, zeigte Sin3a eine auffällige Kolokalisation mit P(S5)-Pol II in ChIP-seq Profilen. Um die Hierarchie der Bindungsereignisse weiter zu charakterisieren, wurden neben „loss-of-function“ und „gain-of-function“ Ansätzen für p65 und Sin3a auch Transkriptions-Inhibitor Experimente durchgeführt, um die RNA-Pol II Bindung bzw. Aktivität zu manipulieren. Dazu wurden KB Zellen mit Actinomycin D (ActD), DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) und α -Amanitin vorbehandelt und die Bindungsereignisse am

IL8 Locus analysiert. Die Eigenschaften der verwendeten Inhibitoren sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die verwendeten Dosen und Inkubationszeiten wurden zuvor mittels RT-qPCR anhand der *IL8* mRNA Expression ausgetestet (Daten nicht gezeigt).

Eigenschaft	Actinomycin D	DRB	α -Amanitin
Ziel	DNA Interkalation	CDK9 in P-TEFb	RNA-Pol II
Konsequenz für RNA-Pol II	Elongation inhibiert, CTD Hyperphosphorylierung	Elongation inhibiert, CTD S2 Dephosphorylierung	Degradation von RNA-Pol II, RNA Synthese inhibiert
Reversibilität	schwach	ja	nein
Wirkzeit	schnell [min]	schnell [min]	langsam [h]
Konzentration	>1 μ g/ml (in DMSO)	100 μ M (in DMSO)	>2 μ g/ml (in H ₂ O)

Tabelle 3: Überblick über verwendete Transkriptionsinhibitoren und deren Eigenschaften.
(Tabelle modifiziert nach [188])



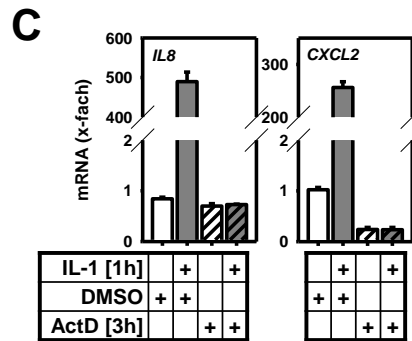
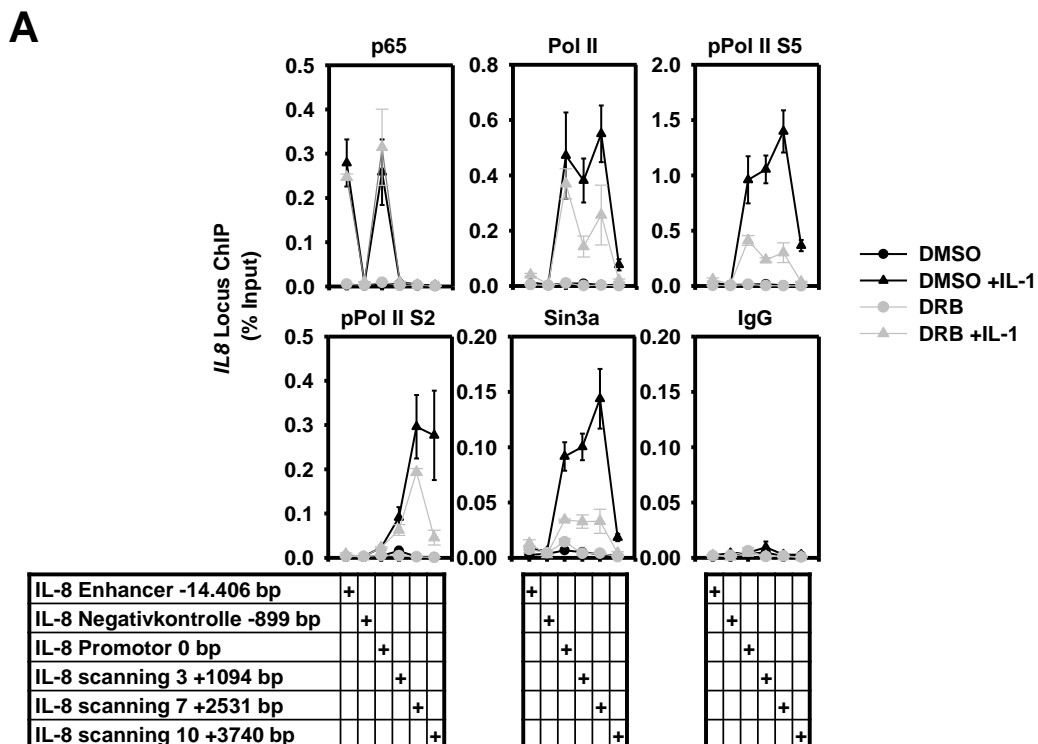


Abbildung 46: Actinomycin D blockiert die Rekrutierung von p65, RNA-Pol II und Sin3a. Schematische Darstellung der amplifizierten PCR-Regionen am *IL8* Locus (Abbildung modifiziert nach [100]) (A). KB Zellen wurden für 3 h mit Actinomycin D [5 µg/ml] bzw. DMSO [0,05%] vorbehandelt und in der angegebenen Kombination mit IL-1α [10 ng/ml/ 1 h] stimuliert. Die Chromatinbindung der genannten Proteine wurde in der ChIP am *IL8* Locus überprüft. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- s.e.m. [% Input] aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (B). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde mittels RT-qPCR quantifiziert und die Mittelwerte +/- s.e.m. als x-fache Regulation aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt (C).

Es wurde sowohl die Promotor-, als auch die Enhancer-Region untersucht, sowie der *IL8* Genkörper (Abb.46A). Neben den Bindungsereignissen der drei Faktoren p65, RNA-Pol II und Sin3a, wurde auch die Aktivität der Polymerase anhand der Phosphorylierungen an Serin 5 bzw. 2 analysiert. Actinomycin D-behandelte Zellen zeigten nahezu keine Bindung von p65, RNA-Pol II und Sin3a am gesamten *IL8* Locus (Abb.46). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* war ebenfalls vollständig inhibiert (Abb.46C).



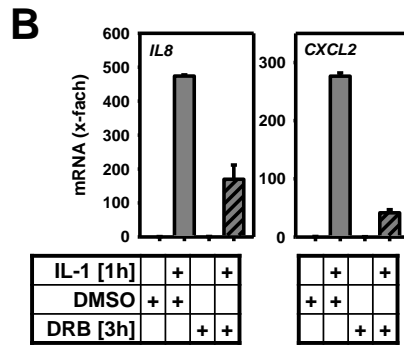
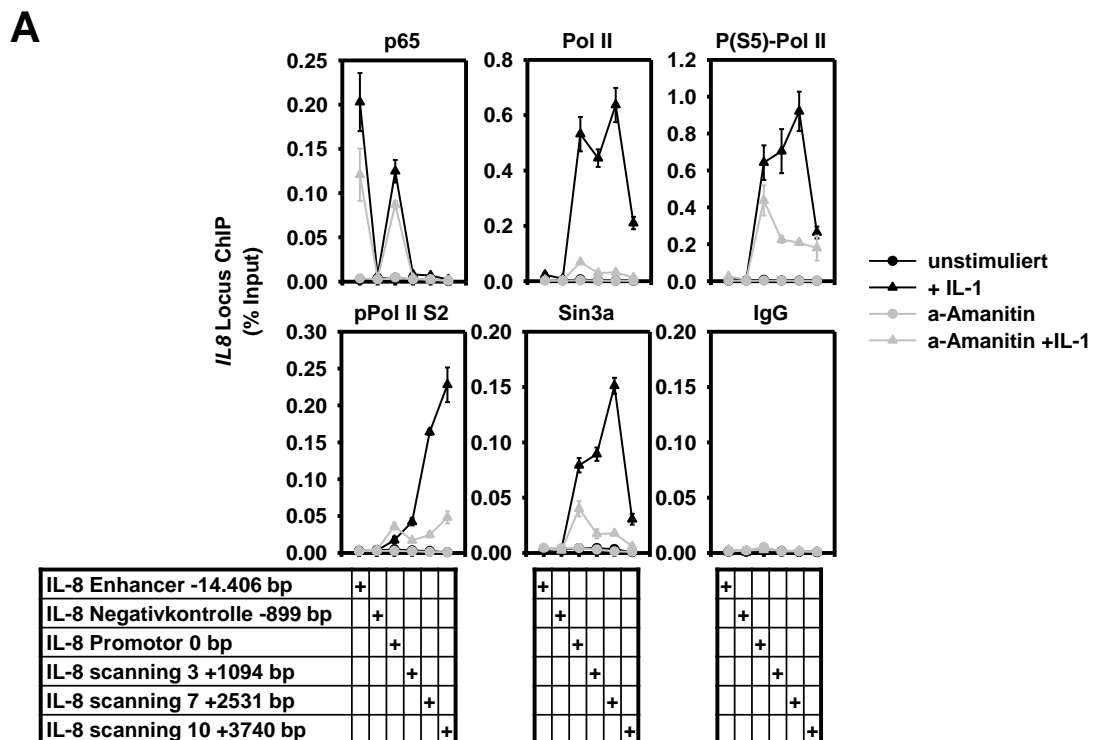


Abbildung 47: DRB hemmt die Transkriptionselongation durch RNA-Pol II und vermindert die Sin3a Rekrutierung. KB Zellen wurden für 3 h mit DRB (5,6-Dichlorobenzimidazole 1- β -D-ribofuranoside) [100 μ M] bzw. DMSO [0,13%] vorbehandelt und in der angegebenen Kombination mit IL-1 α [10 ng/ml/ 1 h] stimuliert. Die Chromatinbindung der genannten Proteine wurde in der ChIP am *IL8* Locus überprüft. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (**A**). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde mittels RT-qPCR quantifiziert und die Mittelwerte \pm s.e.m. als x-fache Regulation aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt (**B**).

In DRB-behandelten Zellen war die p65 Bindung am Enhancer und Promotor kaum verändert (Abb.47A). Die Rekrutierung von RNA-Pol II am Promotor war ebenfalls nur wenig beeinflusst, während die Bindung an den Exonen reduziert war. Die Phosphorylierung an Serin 5 zeigte eine deutliche Reduktion am gesamten *IL8* Gen. Dies war auch für Sin3a zu beobachten. Die Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde durch DRB partiell inhibiert (Abb.47B).



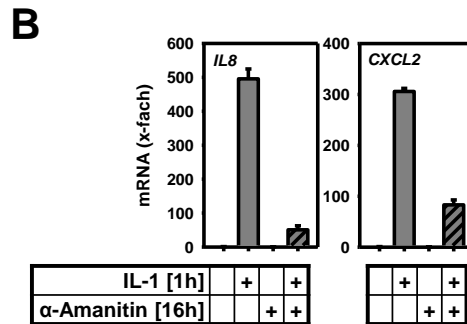


Abbildung 48: α -Amanitin reduziert die RNA-Pol II Bindung und hemmt die Sin3a Rekrutierung. KB Zellen wurden für 16 h mit α -Amanitin [5 μ g/ml] vorbehandelt und in der angegebenen Kombination mit IL-1 α [10 ng/ml/ 1 h] stimuliert bzw. nicht behandelt. Die Chromatinbindung der genannten Proteine wurde in der ChIP am *IL8* Locus überprüft. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm s.e.m. [% Input] aus zwei unabhängigen Experimenten (A). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde mittels RT-qPCR quantifiziert und die Mittelwerte \pm s.e.m. als x-fache Regulation aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt (B).

α -Amanitin führte zu einer leichten Steigerung der p65 Bindung am Enhancer und Promotor. Die RNA-Pol II zeigte nur wenig Bindung am gesamten *IL8* Gen, während die Phosphorylierungen an Serin 2 und 5 ebenfalls gehemmt waren. Die Sin3a Rekrutierung lag am gesamten *IL8* Gen reduziert vor (Abb.48A). Die Expression der beiden untersuchten Zielgene war deutlich gehemmt (Abb.48B). Die verwendeten Transkriptions-Inhibitoren zeigten, dass die p65 Bindung am *IL8* Gen weder von der Bindung oder Aktivität der RNA-Pol II, noch von der Sin3a Rekrutierung abhängig ist. Die Sin3a Rekrutierung unterliegt dagegen sowohl der Pol II Bindung als auch ihrer Aktivität (Abb.49).

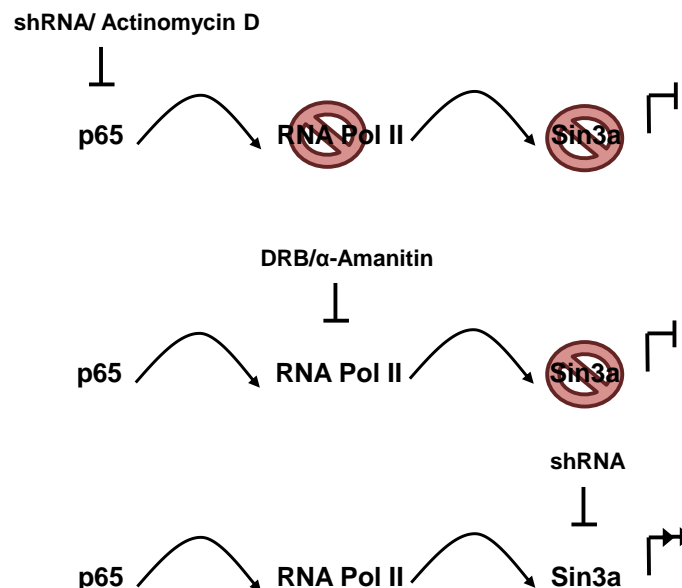


Abbildung 49: Zusammenfassende schematische Darstellung der hierarchischen Bindungsereignisse von p65, RNA-Pol II und Sin3a an NF- κ B Zielgenen. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe des shRNA-vermittelten *knockdowns* von p65 bzw. Sin3a, sowie pharmakologischer

Hemmung der Transkription, die Hierarchie der Bindungsereignisse an IL-1-induzierten NF- κ B Zielgenen näher charakterisiert werden. Eine Hemmung von p65 und RNA-Pol II bewirkte eine Reduktion der Sin3a Rekrutierung, während eine Verminderung der Sin3a Proteinmenge die Bindung der beiden primären Faktoren nicht beeinflusste, aber zu einer gesteigerten Genexpression der Zielgene führte.

5.4.6 Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Sin3a und p65 bzw. RNA-Pol II

Die Bindungsanalysen und Untersuchungen der Hierarchie der drei Faktoren p65, RNA-Pol II und Sin3a zeigten, dass Sin3a sowohl von p65, als auch von der RNA-Pol II Bindung und Aktivität abhängig ist (Abb.41, 46, 47 und 48). Um eine direkte Interaktion der Faktoren nachzuweisen, wurden Ko-Immunopräzipitationen (Ko-IPs) aus Ganzzelllysaten (Abb.51, 52) und „Half-Way“ ChIPs (Abb.53) aus Chromatin-Lysaten durchgeführt.

In Ko-IPs war eine schwache Interaktion zwischen p65 und Sin3a nur in Sin3a-MYC überexprimierenden Zellen detektierbar (Daten nicht gezeigt). Die Signale wurden deutlicher, wenn beide Interaktionspartner überexprimiert wurden (Abb.51, 52). Neben einem Wildtyp mSin3a-MYC Konstrukt wurde auch die Interaktion von verkürzten Sin3a Konstrukten mit p65 untersucht, um die p65-interagierende Domäne zu identifizieren. Die verschiedenen Konstrukte sind in Abbildung 50A dargestellt. Die Expression dieser Konstrukte wurde zunächst im Westernblot überprüft (Abb.50B). Die Proteingrößen entsprachen den angegebenen Konstrukten und eine IL-1 Stimulation hatte keinen Einfluss auf die Proteinmengen. Die Effekte der Konstrukte auf die Expression der IL-1 Zielgene *IL8* und *CXCL2* wurden mittels RT-qPCR analysiert (Abb.50C). Beide waren nur minimal reduziert oder nicht beeinflusst.

Die Ko-IPs wurden in p65-HA und Sin3a-MYC bzw. Sin3a-Varianten überexprimierenden HeLa Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Proteine mit einem MYC bzw. p65 Antikörper präzipitiert. Die Expression der Konstrukte in den Lysaten wurde im Westernblot überprüft (Abb.51A, 52A). In beiden gezeigten Ko-IPs war eine vergleichbare Interaktion von Sin3a-MYC Wildtyp bzw. Sin3a-MYC Δ HID mit HA-p65 detektierbar (Abb.51B, 52B). Diese Interaktion war in den Konstrukten N479 und PAH3+HID dagegen deutlich geschwächt bzw. war kaum mehr nachweisbar, wenn über den Myc-Tag das Myc-Sin3a ko-immunopräzipitiert wurde (Abb.52B). Eine Stimulation der Zellen mit IL-1 spielte für die Interaktion keine Rolle (Abb.51B). Eine Interaktion zwischen endogener RNA-Pol II und exogenem Sin3a bzw. p65 konnte in diesen Ko-IPs nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die durchgeführten Ko-IPs zeigten, dass Sin3a im Überexpressionssystem IL-1-unabhängig mit

p65 interagieren kann, wobei die PAH4-Domäne am C-Terminus von Sin3a für eine stabile Interaktion benötigt wird.

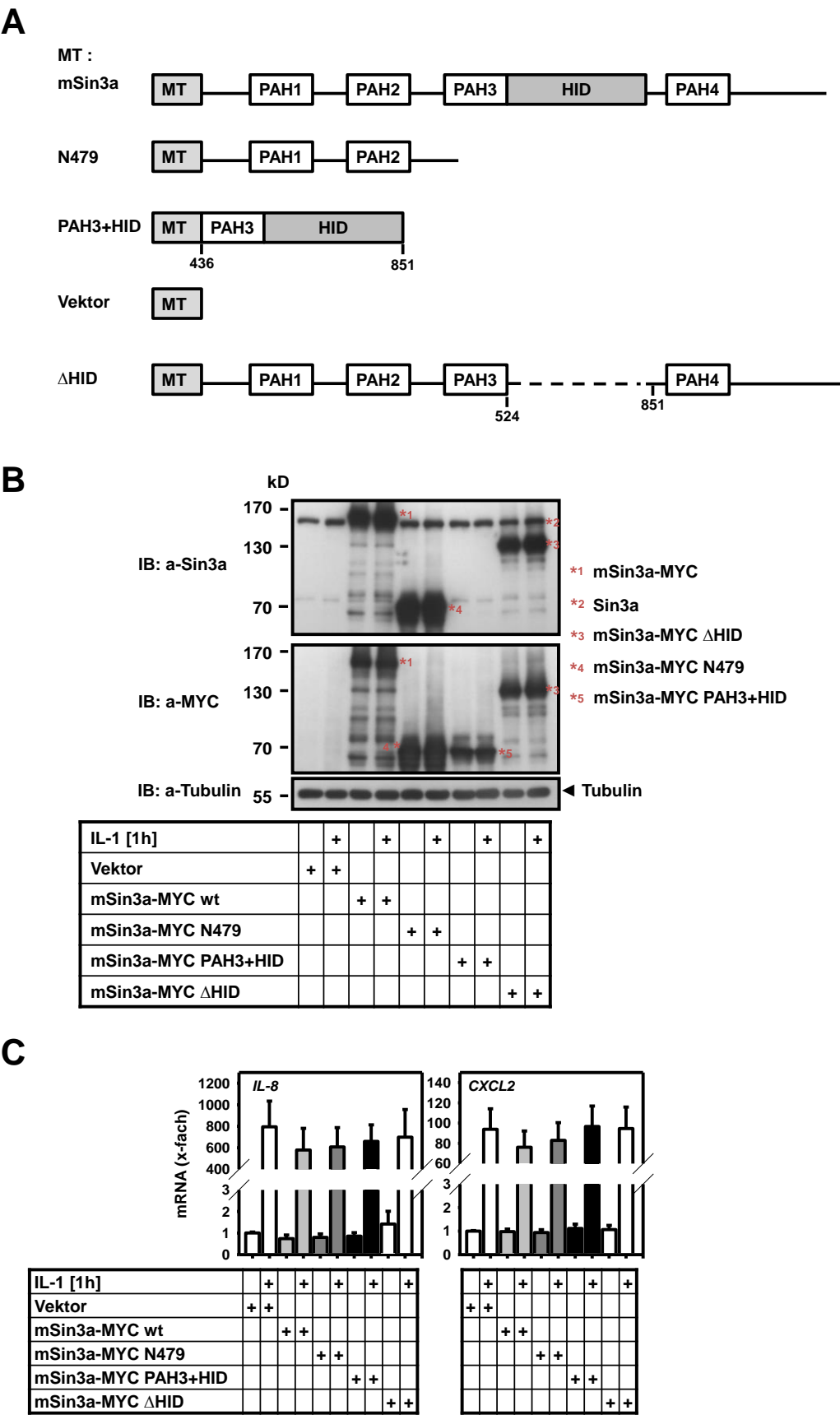


Abbildung 50: Expression von verkürzten Sin3a-Konstrukten. Schematische Darstellung der Sin3a-Konstrukte (Abbildung modifiziert nach [136]) (A). HeLa Zellen wurden mit pCS2+MT Kontrollvektor bzw. mSin3a-MYC-Konstrukten transient transfiziert und 24 h nach der Transfektion für 1 h mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert. Die Expression der Proteine wurde mit den angegebenen Antikörpern im Westernblot analysiert. Tubulin diente als Ladungskontrolle (B). Die mRNA Expression von *IL8* und *CXCL2* wurde mittels RT-qPCR quantifiziert und die Mittelwerte \pm s.e.m. als x-fache Regulation aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt (C).

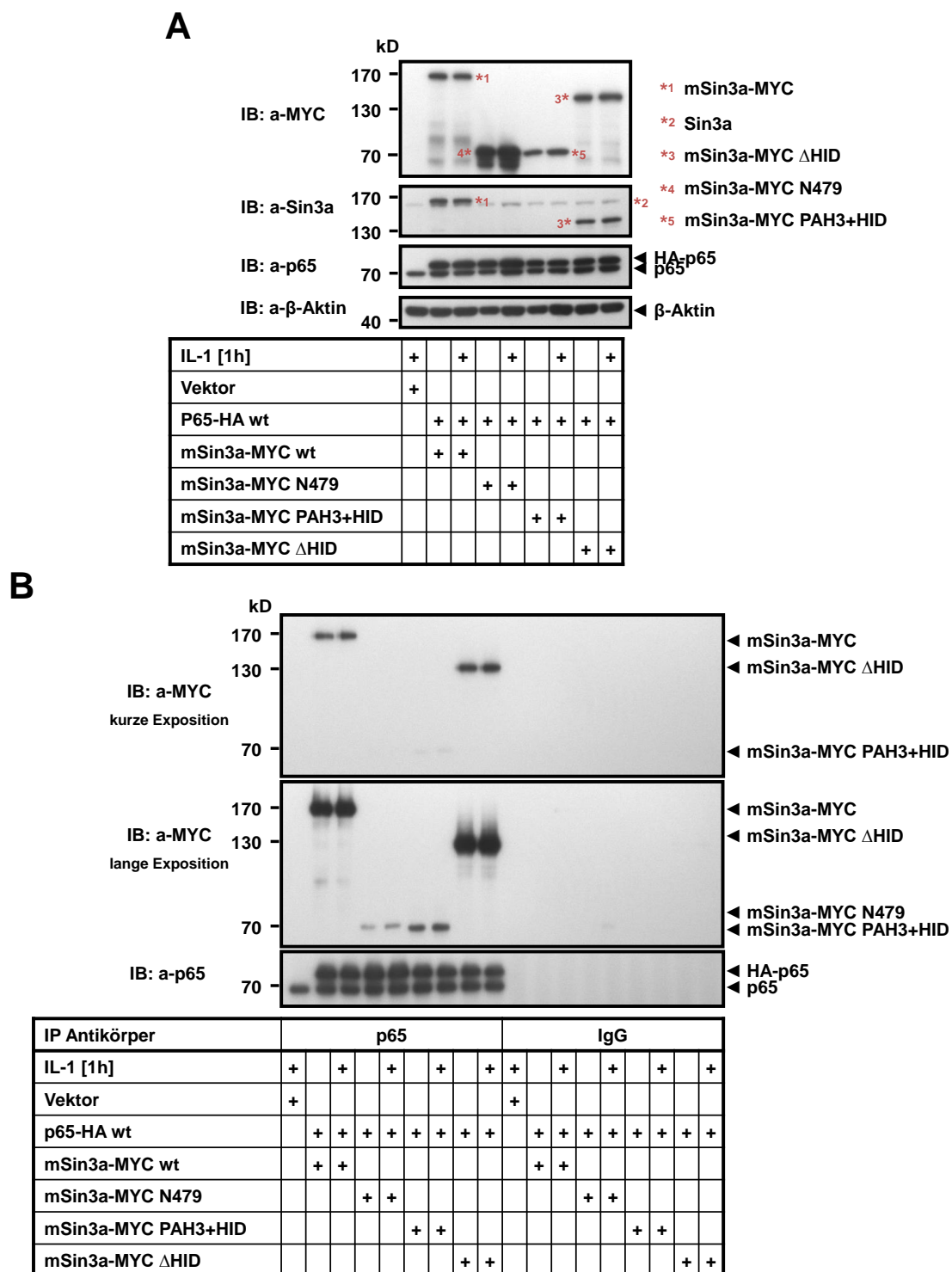


Abbildung 51: IL-1-unabhängige Interaktion von p65 und Sin3a. HeLa Zellen wurden transient mit den angegebenen mSin3a-Konstrukten bzw. dem Kontrollvektor in Kombination mit gleichen Mengen

HA-p65 transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit IL-1 α [10 ng/ml/ 1 h] stimuliert bzw. nicht behandelt. Es wurde eine Ko-IP mit anti-p65 bzw. Kaninchen IgG durchgeführt und die Lysate (**A**) und präzipitierten Proteine (**B**) im Westernblot analysiert. β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

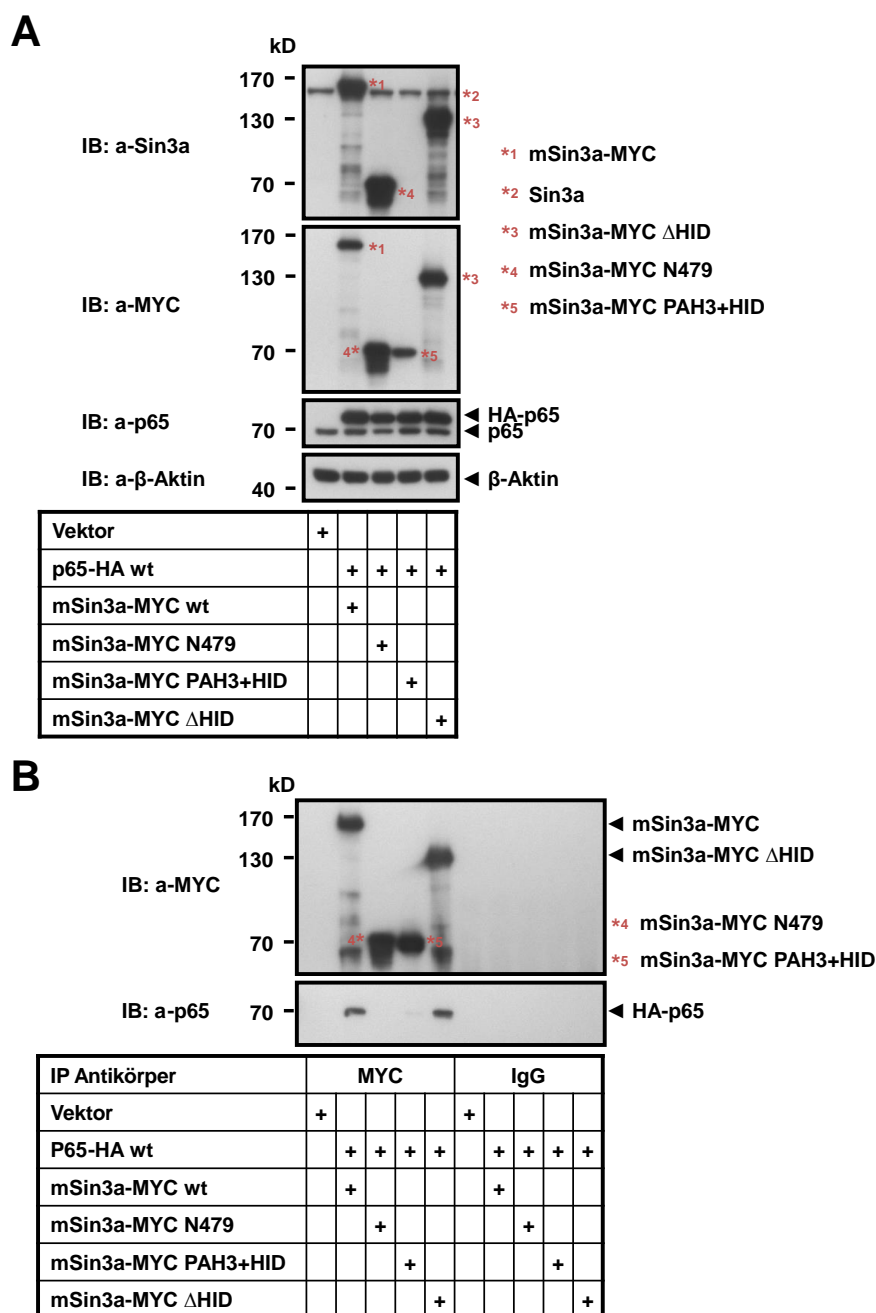


Abbildung 52: Interaktion von Sin3a und p65. HeLa Zellen wurden transient mit den angegebenen mSin3a-Konstrukten bzw. dem Kontrollvektor in Kombination mit gleichen Mengen HA-p65 transfiziert. Es wurde eine Ko-IP mit anti-MYC bzw. Maus IgG durchgeführt und die Lysate (**A**) und präzipitierten Proteine (**B**) im Westernblot analysiert. β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

Um eine Interaktion am Chromatin nachzuweisen, wurden Chromatin-Immunopräzipitate im Westernblot analysiert („Half-Way“ ChIP) (Abb.53). Hier wurde nur Sin3a-MYC Wildtyp in einem Teil der Proben überexprimiert. Die Lysate wurden bereits in Abbildung 45C

dargestellt. Da die Proben sowohl spezifisch präzipitierte Proteine, als auch durch Formaldehyd verknüpfte DNA und RNA enthielten, war eine saubere Trennung der Proteinbanden schwierig. Dennoch konnte ein spezifisches Signal für exogenes Sin3a in der p65-IP, sowie RNA-Pol II in der Sin3a-IP detektiert werden. Die Interaktionen waren nur in jeweils eine Richtung nachweisbar. Die ko-immunopräzipitierte RNA-Pol II zeigte schwächere Signale in den Sin3a-überexprimierten Proben. Dies war bereits für die Expression der Polymerase in den Lysaten zu erkennen (Abb.45C).

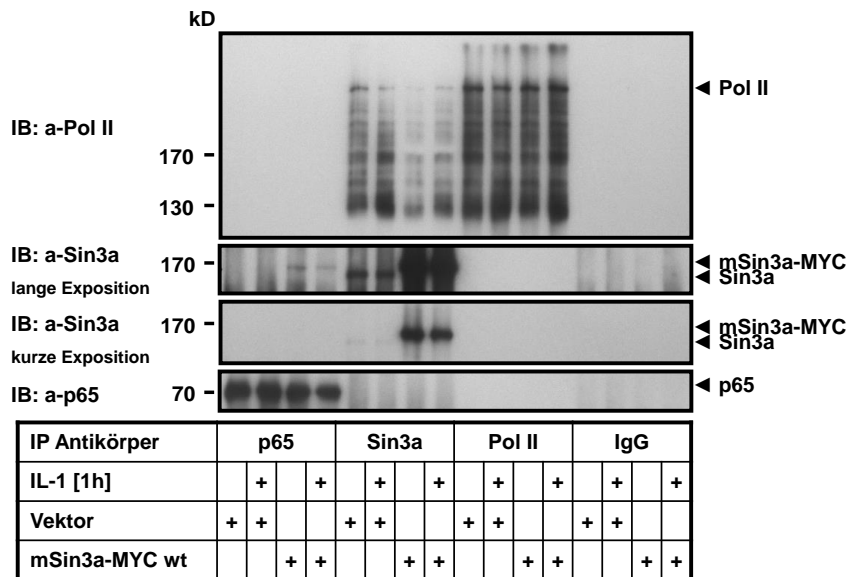


Abbildung 53: IL-1-unabhängige Interaktion von Sin3a mit p65 und RNA-Pol II am Chromatin.

HeLa Zellen wurden transient mit mSin3a-MYC bzw. dem Kontrollvektor transfiziert und 24 h nach der Transfektion mit IL-1 α [10 ng/ml/ 1 h] stimuliert bzw. nicht behandelt. Es wurde eine ChIP mit den angegebenen Antikörpern bzw. Kaninchen IgG als Negativkontrolle durchgeführt und die Lysate (in Abbildung 45C gezeigt) und präzipitierten Proteine („Half-Way“ ChIP) im Westernblot analysiert.

Zusammenfassend konnte in Kapitel 5.4 gezeigt werden, dass p65 als Masterregulator für die IL-1-abhängige Rekrutierung von RNA-Pol II und Sin3a fungiert. Die Rekrutierung von p65 ist für die Bindung und Aktivität der RNA-Pol II essentiell, welche wiederum für die Rekrutierung von Sin3a notwendig ist. Ein Verlust von Sin3a hat dagegen keine Auswirkungen auf die beiden primären Faktoren. Sin3a interagiert direkt mit p65 über seine PAH4-Domäne und geht Interaktionen mit der RNA-Pol II ein. In humanen Zellen wird die Expression der IL-1 Zielgene *IL8* und *CXCL2* im Sin3a-*knockdown* gesteigert, während in murinen Zellen die Expression einiger IL-1 Zielgene gehemmt, die anderer aber induziert wird. Die Daten weisen Sin3a eine modulierende Funktion für die Expression inflammatorischer Gene zu, die durch Integration in genspezifische Pol II-Komplexe reguliert sein könnte. Hierbei scheint Sin3a als Pol II-assoziertes *Scaffold* Protein zu fungieren.

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung von NF- κ B p65 als Masterregulator, der die Bindung weiterer Chromatinfaktoren, die Rekrutierung von RNA-Pol II und die Ausbildung von Histonmodifikationen an IL-1-induzierbaren Promotoren und Enhancern vermittelt

In dieser Arbeit wurde die Hierarchie der IL-1-abhängigen Rekrutierung von Untereinheiten der NF- κ B und AP-1 Transkriptionsfaktorfamilien (p65, p50, c-Fos, JunD, c-JUN, FRA1 und ATF2), der RNA-Polymerase II und das Auftreten von Enhancer-spezifischen Histonmodifikationen (H3K4me1 und H3K27ac) an den *IL8* und *CXCL2* Loci näher untersucht.

Die prinzipielle Bindung der untersuchten Transkriptionsfaktoren an diesen Loci ist bereits bekannt [14, 177, 189, 190]. Die Menge, die subzelluläre Lokalisation und der Aktivierungsstatus (z.B. durch posttranslationale Modifikationen) von NF- κ B und AP-1 Faktoren werden in verschiedenen Zelltypen durch eine Vielzahl an Stimuli über unterschiedliche Mechanismen reguliert. Letztlich binden diese Transkriptionsfaktoren aber oft an gemeinsam regulierte Zielgene als „Endstrecke“ der Signaltransduktion wie z.B. an das *IL8* Gen [191, 192]. Jenseits der Bindungsereignisse ist in der Regel aber oft keine kausale Evidenz verfügbar, wie und wann eine NF- κ B oder AP-1 Untereinheit einen molekularen Prozess am Chromatin reguliert. Diese Aussage trifft insbesondere für das IL-1 System zu [189, 191].

Mittels Chromatin-IPs konnte in p65-defizienten HeLa-Zellen gezeigt werden, dass die Rekrutierung der hier untersuchten Transkriptionsfaktoren an die Promotoren und Enhancer von *IL8* und *CXCL2* direkt von der p65-Präsenz abhängig ist (Abb.8A, 8B). p65 ermöglicht als essentieller Transkriptionsfaktor nicht nur die Bindung dieser ko-regulierenden Faktoren, sondern wird auch für die Aktivierung der Klasse II-Enhancer nach einem IL-1 Stimulus benötigt (Abb.9, 10). Während die bereits bestehende und IL-1-unabhängige Monomethylierung an H3K4 in den p65-*knockdown* Zellen kaum beeinflusst ist, wird die weitere Öffnung des Chromatins und die Acetylierung an H3K27 in diesen Zellen inhibiert (Abb.9, 15).

Die Stimulation mit IL-1 verändert dabei auch die Nukleosomendichte, sodass der Locus zugänglicher für Transkriptionsfaktoren, Ko-Faktoren und die Transkriptionsmaschinerie wird. Einige Promotoren inflammatorischer Gene benötigen Chromatin-remodellierende Faktoren wie z.B. den Swi/Snf-Komplex, während andere Swi/Snf-unabhängig induziert

werden können [84, 193]. Viele rasch induzierbare NF- κ B Zielgene können ohne Nukleosomen-remodellierende Komplexe aktiviert werden [84, 194]. Diese Promotoren enthalten meist CpG-Inseln, besitzen eine offene Chromatinstruktur und aktivierende Histonmodifikationen, z.B. H3K9ac [77, 84, 194, 195]. Das untersuchte CXC-Cluster auf Chromosom 4 besitzt CpG-haltige Promotoren [84, 196] und weist aktivierende Histonmodifikationen und eine relativ offene Chromatinstruktur auf, die durch IL-1 jedoch noch weiter geöffnet wird. Die Depletion von p65 zeigt, dass p65 für diesen Prozess essentiell ist (Abb.9). Eine Mehrheit aller schnellen, Signal-abhängigen NF- κ B Bindungen findet in Regionen statt, die auch in unstimulierten Zellen eine geringe Nukleosomendichte aufweisen [197]. Somit fallen die Promotoren des hier untersuchten CXC-Clusters nicht unerwartet in die Gruppe der schnell-induzierbaren Promotoren [198], die durch NF- κ B p65 für eine rasche Induktion aktiviert werden.

Im Gegensatz zur Monomethylierung an H3K4 wird die Acetylierung an H3K27 an den untersuchten Promotoren und vor allem Enhancern durch die IL-1 Stimulation gesteigert [177]. Dieser induzierte Effekt wird durch die Depletion von p65 ebenfalls gehemmt (Abb.9). Die H3K27ac unterscheidet konstitutiv aktive von noch weiter aktivierbaren Enhancern [85, 199, 200]. Die Acetylierung wird dabei durch die Histonacetylase Ep300/CBP vermittelt, daher stellt die Bindung dieser HATs ein zusätzliches „*enhancer mark*“ dar [73, 78, 201]. Der Verlust von p65 verhindert die Formierung und damit Aktivierung der Enhancer an *IL8* und *CXCL2* (Abb.9). Neben den Modellloci *IL8* und *CXCL2* wurden noch zwei weitere Enhancer-Regionen untersucht, welche ebenfalls als Klasse II-Enhancer charakterisiert wurden (Abb.10) [177]. Hier konnten die inhibitorischen Effekte der p65-Depletion auf die induzierbare Acetylierung an H3K27 validiert werden. Da die vorgeschalteten zytosolischen Signalwegkomponenten, die nicht direkt durch p65 reguliert werden, durch den *knockdown* von p65 kaum beeinträchtigt waren (Abb.8D), sind die beobachteten Effekte hauptsächlich auf den Verlust von p65 zurückzuführen. Zhang *et al.* konnten in ChIP-seq Analysen in VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*)-stimulierten HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) zeigen, dass die dynamische Deposition von H3K27ac und die assoziierte Veränderung der Chromatinkonformation an Enhancern nach einer Stimulation die Aktivität von Ep300 benötigen [201]. p65 könnte somit für die Rekrutierung von Ep300/CBP in HeLa-Zellen essentiell sein, welches die anschließende Aktivierung der H3K4me1-vormarkierten Enhancer initiiert. Im p65-*knockdown* konnte auf sehr niedrigem Niveau eine reduzierte Bindung von CBP gezeigt werden [177]. Dies kann für Ep300 in nachfolgenden analogen Experimenten überprüft werden.

Im Vergleich zum p65-*knockdown* besitzt die Depletion zweier ausgewählter AP-1 Faktoren (JunD und c-Fos) kaum Einfluss auf die p65 Bindung und Ausbildung der IL-1-abhängigen

Effekte an den Promotoren und Enhancern (Abb.14). Dies bestätigt die beobachtete Hierarchie der Bindungsereignisse und somit die Rolle von p65 als Master-Transkriptionsfaktor, der die Ausbildung eines Transkriptionsfaktor-Kollektivs an IL-1-abhängigen Promotoren und Enhancern ermöglicht. AP-1 Faktoren üben womöglich Funktionen bei der Feinjustierung der Enhancer-Aktivierung oder Regulation der Genaktivierung aus. Khanjani *et al.* konnten in Zellen des humanen Myometriums im Uterus ebenfalls zeigen, dass NF- κ B nach einer IL-1 β Stimulation eine zentrale Rolle für die nachfolgenden Rekrutierungsereignisse von AP-1 Faktoren am *IL8* Locus einnimmt. Mutationen der AP-1 Bindestelle oder siRNA-vermittelter *knockdown* von AP-1 Faktoren reduzierte die *IL8* Expression nur schwach, während die Depletion von NF- κ B die Expression deutlich verminderte [192]. Die Mutationen der Bindestelle basierten jedoch auf Plasmid-Konstrukten, und spiegeln nicht den Chromatin-assoziierten endogenen Locus wieder.

Die Hemmung der *IL8* und *CXCL2* mRNA Spiegel war in p65-*knockdown* Zellen komplett (Abb.8C). Dies geschah offenbar durch eine vollständige Abschaltung der Gentranskription, da die Rekrutierung der RNA-Polymerase II inhibiert wurde (Abb.8A, 8B). In Epithelzellen ist p65 daher ein essentieller, nicht ersetzbarer Faktor für die Expression dieser Chemokingene. Die Transkription in Eukaryoten hängt von der Assemblierung des Präinitiationskomplexes (PIC) am Kernpromotor nahe dem Transkriptionsstart ab [202]. Ein prototypischer PIC besteht aus mehr als 85 Polypeptiden [203]. Der Kernpromotor enthält die TATA-Box, welche vom TATA-bindenden Protein (TBP/TFIID) erkannt wird. Dies führt zur Formierung eines generellen Transkriptionsfaktor-Komplexes, der TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH, TAF Untereinheiten und einen großen Mediator-Ko-Aktivator-Komplex enthält und die RNA-Polymerase II rekrutiert, sodass die Transkription gestartet werden kann. Die RNA-Pol II besteht aus 12 Untereinheiten, ist in Eukaryoten hoch konserviert und dient als die zentrale katalytische Komponente des PIC [203, 204]. Die Elongation der Transkription benötigt zusätzliche Modifikationen des PIC und des umgebenen Chromatins. Dazu werden weitere Aktivatoren, Chromatin-modifizierende Enzyme und Elongationsfaktoren rekrutiert. Die Erkennung der Kernpromotor-Sequenz ist der erste Schritt in der Transkription und könnte primär durch NF- κ B p65 reguliert werden [205]. An vielen rasch induzierbaren Genen ist der PIC bereits vorgebunden und wird erst durch einen Stimulus aktiviert, sodass eine schnellere Induktion der Gene gewährleistet ist [84, 206]. Es existieren aber auch Beobachtungen, dass das Vorhandensein einer pausierenden Polymerase und eine offene Chromatinstruktur keine essentiellen Voraussetzungen für die schnelle Aktivierung von Genen darstellen [207, 208]. Barboric *et al.* konnten bereits eine Interaktion *in vivo* und *in vitro* zwischen NF- κ B p65 und P-TEFb nach einer Stimulation mit TNF α nachweisen. Dabei triggert TNF α die Rekrutierung von P-TEFb zum NF- κ B-regulierten *IL8* Gen. Dies kann durch den P-TEFb-Inhibitor DRB gehemmt werden [4]. P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*) phosphoryliert die

Rbp1 Untereinheit der Polymerase in der C-terminalen Domäne (CTD) an Serin 2 durch die CDK9-vermittelte Kinase-Aktivität. Dies erlaubt die Elongation der Transkription [209]. Viele Faktoren, die eine Rekrutierung von P-TEFb fördern, z.B. NF- κ B, können außerdem die Beladung mit der RNA-Polymerase II und die transkriptionelle Initiation stimulieren [77]. Die in dieser Arbeit untersuchten NF- κ B Zielgene weisen eine signifikante RNA-Polymerase II Rekrutierung an die Promotoren erst nach einer Stimulation mit IL-1 und der resultierenden Bindung von p65 auf. Im Gegensatz zu *IL8* kann an *CXCL2* ein relativ schwaches Signal für die RNA-Polymerase II in ChIPs und ChIP-seq Profilen im unstimulierten Zustand am Promotor detektiert werden.

Es stellte sich die Frage, welche apikalen Signalwegkomponenten an den Promotor- und Enhancer-spezifischen Rekrutierungsereignissen und Chromatinveränderungen beteiligt sind. Um den Signalweg weiter einzugrenzen, wurden Schlüsselproteine des kanonischen NF- κ B Signalwegs (TAK1 und IKK2) [210] über spezifische Inhibitoren (5Z-7-Oxozeaenol und PHA-408) oder über einen RNAi-vermittelten *knockdown* gehemmt (Abb.11, 12, 13). Dabei zeigten die Inhibitionen von TAK1 und IKK2 ähnliche Effekte. Beide Proteine waren wichtig für die Aktivierung des p65-p50 Dimers, die Translokation in den Zellkern und dessen Rekrutierung an die untersuchten Zielgene. Durch die resultierende Hemmung der p65 Rekrutierung war die Bindung der Polymerase, die IL-1-induzierte Steigerung der H3K27ac und die Expression von *IL8* und *CXCL2* stark reduziert (Abb.11, 12, 13). Dabei wies der TAK1-Inhibitor den stärksten Hemmeffekt auf die H3K27 Acetylierung auf (Abb.12). Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass der TAK1-IKK2-p65 Signalweg eine fundamentale Rolle für die Ausbildung von Promotor- und Enhancer-Komplexen und der induzierten H3K27 Acetylierung einnimmt, um die maximale mRNA Expression der IL-1 Zielgene *IL8* und *CXCL2* zu ermöglichen. Diese Ergebnisse definieren damit eine neue Signalkaskade, die IL-1-abhängig spezifische Loci im Genom an H3K27 acetyliert.

In der Literatur wird bereits diskutiert, ob NF- κ B eine Pionier-Funktion an Promotoren und regulatorischen Elementen besitzen könnte [114, 205, 211, 212]. Allgemein wird angenommen, dass ein Pionier-Faktor an kompakte bzw. heterochromatische nukleosomale DNA binden sollte, um lokale Chromatin-Remodellierungen zu initiieren, sodass für weitere TFs/Ko-Aktivatoren zugängliche DNA-Bereiche entstehen [213]. Pionier-Faktoren werden daher bereits früh-embryonal exprimiert und bleiben während der Zelldifferenzierung bestehen. Die über Zellteilungen hinweg vererbte Assoziation mit Promotoren und Enhancern führt zu einer Zelltyp-spezifischen Chromatin-Architektur, die zum einen die stabile Expression von Differenzierungsgenen vermittelt, welche den Phänotyp der Zelle erhalten, andererseits aber auch immer noch zugänglich für weitere Stimulus-induzierte Transkriptionsfaktoren bleibt [77]. Für NF- κ B Dimere wurde aufgrund ihrer dreidimensionalen

Struktur lange vermutet, dass sie nicht an Nukleosomen binden können. Dies würde ausschließen, dass NF- κ B eine Pionier-Stellung einnimmt [205]. Für p50 und p52 konnte jedoch eine Bindung an nukleosomale DNA gezeigt werden [205, 214, 215]. Ein Beispiel für einen sehr gut definierten Pionier-Faktor in wichtigen Immunzellen (B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen) ist PU.1. Seine Anwesenheit geht mit der Depletion von Nukleosomen und der H3K4 Monomethylierung der umgebenden Histone einher, wodurch erst die Bindung vieler weiterer Chromatinfaktoren gebahnt wird [73, 74]. PU.1 ist daher ähnlich wie p65 in den hier untersuchten Epithelzellmodellen auch essentiell für die Expression von inflammatorischen Genen im LPS Signalweg [73]. Im Unterschied zu PU.1 zeigte sich im *knockdown* von p65 in HeLa-Zellen allerdings kein Einfluss auf die bestehende H3K4 Monomethylierung (Abb.15). Daher muss noch ein weiterer Faktor existieren, der in HeLa und KB Zellen die Rolle eines Pionier-Faktors übernimmt und so die untersuchten Zielloci auf eine spätere Stimulus-abhängige Bindung von p65 vorbereitet. Diese neuen Ergebnisse zeigen, dass das Repertoire an Pionier-Faktoren und essentiellen Chromatinregulatoren zell- und stimulusabhängig angelegt ist und dadurch auf Chromatinebene IL-1- und LPS-Signale unterschiedlich molekular verschalten werden können.

6.2 Identifizierung neuer Ko-Regulatoren des nukleären IL-1 Signalwegs

Wie aus den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen und den bisherigen Ausführungen dazu hervorgeht, sind die nukleären Prozesse der NF- κ B-regulierten Genexpression sehr komplex und immer noch unvollständig verstanden. Viele Regulationsmechanismen arbeiten kooperativ und beeinflussen sich gegenseitig. Durch eine Fülle an posttranslationalen Modifikationen von beteiligten Proteinen bzw. Proteinkomplexen und dynamischen Konformationsänderungen des Chromatins, existieren zahlreiche Kombinationsmöglichkeiten der agierenden Mechanismen. Neben Pionier-Faktoren, sowie essentiellen Masterregulatoren, sind verschiedene Ko-Regulatoren an entscheidenden Prozessen wie Chromatin-Remodellierung, Modifikationen von Histon- und Nicht-Histon-Proteinen, Rekrutierung von weiteren Faktoren, Aktivierung, Inhibierung oder Termination von Reaktionen beteiligt. Um neue Ko-Regulatoren von NF- κ B zu identifizieren, wurden bisher einige RNAi-Screens durchgeführt. Dabei basieren die meisten genomweiten [26, 216-219] oder auf spezifische Proteingruppen limitierten [220-222] Screens auf der artifiziellen Integration von Reportergenkonstrukten (z.B. für *Firefly Luciferase* oder GFP), die sich gut für genomweite, automatisierte und miniaturisierte Assays eignen, aber nicht die natürliche Chromatin-Umgebung rekapitulieren können. Durch die RNAi-vermittelte Depletion von Proteinen können außerdem indirekte oder sekundäre Effekte auftreten, ein Fakt, der stets

bei der Validierung von potentiellen Kandidaten berücksichtigt werden muss. Ein alternativer Ansatz, um neue nukleäre Ko-Regulatoren von NF- κ B zu identifizieren, die direkt am Chromatin binden oder die Chromatinregulation endogener Loci von NF- κ B Zielgenen bewirken, ist die Durchführung von ChIP-seq Experimenten. Durch die genomweite (Ko)-Lokalisation der beteiligten Proteine z.B. mit p65 oder durch Untersuchung der umgebenden DNA-Sequenz auf abundante Bindemotive mittels *de novo* Motivanalyse, können neue NF- κ B Ko-Regulatoren postuliert werden. Beispielsweise konnten Lim *et al.* in ChIP-seq Analysen eine Überrepräsentation von E2F1-Bindemotiven in der Nähe von p65-gebundenen Loci nachweisen. Sie identifizierten E2F1 als transkriptionellen Regulator von einigen LPS-stimulierten NF- κ B Zielgenen in Monozyten [223]. Ein Vorteil dieser Herangehensweise ist das Vermeiden von *off-target* Effekten durch si/shRNAs. Außerdem müssen die verwendeten Zellen genetisch nicht manipuliert werden. Ein Nachteil der *de novo* Motivanalyse ist, dass unbekannte Faktoren ohne hoch-konserviertes Bindemotiv oder ko-rekrutierte Faktoren, nicht erfasst werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass ChIP-seq Daten zunächst nur korrelative Evidenz für Ko-Lokalisationen am Chromatin hervorbringen und weitere Experimente nötig sind, um kausale Zusammenhänge zu definieren.

Unter Abwägung dieser Möglichkeiten, wurde in dieser Arbeit ein limitierter RNAi-Screen von 170 ausgewählten Ko-Regulatoren (Abschnitt 7.3) durchgeführt, um neue nukleäre Regulatoren im IL-1 Signalweg zu identifizieren (Abschnitt 5.2). Im Vergleich zu bereits existierenden RNAi-Ansätzen zeichnet sich die hier beschriebene Vorgehensweise durch ein *Readout* (Abb.19) auf Basis des sorgfältig ausgewählten endogenen IL-1-induzierbaren Zielgens *mCxc12* (Abb.17, 18) aus. Dadurch wurde gewährleistet, dass die beobachteten Auswirkungen der *knockdowns* im natürlichen Chromatin-Kontext stattfinden. Mittels miniaturisiertem Assay mit anschließender Real-Time PCR konnten die erhobenen Messwerte auf eine unstimulierte Kontrollvektor Probe und das validierte „Haushaltsgen“ *mUbe2l3* normalisiert werden (Abb.20, 21). Um eine eventuelle Beeinträchtigung der Expression von *mUbe2l3* durch den shRNA-vermittelten *knockdown* zu berücksichtigen, wurde parallel eine nur auf den Kontrollvektor bezogene Analyse durchgeführt (Abb.21). Durch das Setzen eines strengen Schwellenwerts (*Cut-off*: 4-fache Regulation des Zielgens), wurden 16 potentielle Ko-Regulatoren des IL-1 Signalwegs herausgefiltert (Tab.2). Dieser Schwellenwert wurde nach eigenem Ermessen festgelegt und ermöglichte die Filterung von wenigen, aber sehr starken Effekten auf die Expression des untersuchten Zielgens. Eine Verringerung des Schwellenwerts führte zu einer vielfach erhöhten Anzahl von potentiellen Kandidaten, z.B. der *cut-off* einer 2-fachen Regulation des Zielgens resultierte in 64 *Hit*-Kandidaten (Daten nicht gezeigt). Die Komplexität der nachfolgenden Validierungsexperimente und ChIP-Experimente limitierte eine vollständige Untersuchung

aller dieser potentiellen Kandidaten, sodass eine Fokussierung auf die sechzehn Kandidaten erfolgte.

Die Signifikanz vieler RNAi-Screens wird mit Hilfe eines statistischen Parameters, z.B. dem Z-Faktor ermittelt [26, 224]. Dieser dimensionslose Koeffizient reflektiert die Qualität und Reproduzierbarkeit des verwendeten Assays [225]. Durch die verschiedenen Normierungs- und Auswertungsmöglichkeiten der hier erhobenen Ct-Werte, die mögliche Variabilität einer IL-1-Responsivität und die Verfügbarkeit zweier unabhängiger Screens mit unterschiedlicher Durchführung (3 h vs. 1 h IL-1 Stimulation, Transfektion einzelner shRNAs pro Gen vs. Pool an shRNAs) wurde bei der Filterung der potentiellen Kandidaten auf einen statistischen Parameter verzichtet. Ein vergleichbares Vorgehen wählten Chew *et al.* in einem auf Phosphatasen limitierten RNAi-Screen. In diesem Screen wurde WIP1 als negativer Regulator von NF- κ B in TNF α -stimulierten A549 Zellen identifiziert. Es wurde ebenfalls ein *cut-off* zur Identifizierung der stärksten Effekte verwendet [220].

Bei der Darstellung der berechneten dCt und ddCt-Werte von Screen I (Abb.21) fällt auf, dass nur Ko-Regulatoren, die eine aktivierende Wirkung auf das Zielgen *mCxc12* besitzen, außerhalb des *cut-off's* liegen. Diese Verteilung tritt in Screen II durch die Verwendung von shRNA-Pools nicht auf (Abb.21). Das Poolen von shRNA kann die Effizienz des *knockdowns* steigern und das Auftreten von einzelnen shRNA-Ausreißern vermeiden. Regulatoren, die dennoch in beiden Screens die gleichen starken Effekte aufwiesen (Tab.2), zeigten die stabilsten Ergebnisse und wurden in nachfolgenden Validierungsexperimenten überprüft (Abb.22). Für alle sechzehn *Hit*-Kandidaten bestätigte sich die Reduktion der *mCxc12*-Expression in den *knockdowns* (Abb.22A). Viele dieser selektierten Faktoren weisen keine publizierte molekulare Verbindung zum IL-1/p65 (RelA) Signalweg auf, während für andere z.B. eine funktionelle Verknüpfung bereits existiert (Abb.54).

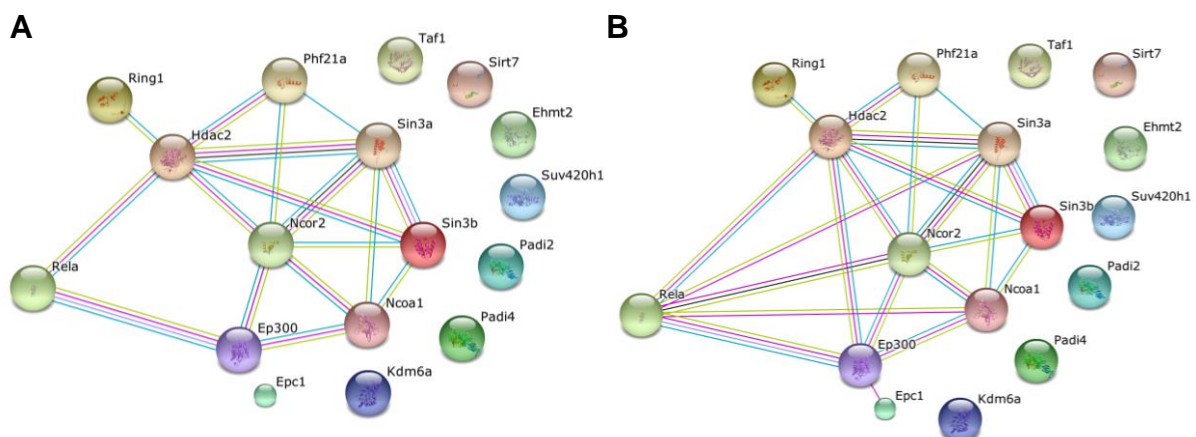


Abbildung 54: Interaktionen zwischen den sechzehn potentiellen Ko-Regulatoren und p65 (RelA). Dargestellt sind Evidenz-basierte Interaktionen [(A) *confidence score medium* 0,4 (B)

confidence score high 0,7] zwischen den 16 potentiellen nukleären Ko-Regulatoren im IL-1 Signalweg und p65 (RelA) mit Hilfe der STRING Datenbank [226].

Ep300 ist, wie bereits diskutiert, eine Histon-Acetyltransferase, die durch NF- κ B rekrutiert wird und als Ko-Aktivator der Genexpression dient [48, 101, 227]. Der shRNA-Screen charakterisierte Ep300 ebenfalls als Ko-Aktivator im IL-1 Signalweg. In den Validierungsexperimenten zeigte Ep300 Aktivator-Funktionen für die meisten gemessenen IL-1 Zielgene (Abb.22B). ChIP-Experimente in KB Zellen bestätigten eine IL-1-abhängige Rekrutierung dieses Faktors an die *IL8* und *CXCL2* Promotoren und Enhancer (Abb.26). Somit diene Ep300 als interne Positivkontrolle für einen Ko-Aktivator im IL-1 Signalweg.

Kdm6a (UTX) und Kdm6b (JMJD3) sind H3K27-Demethylasen [228]. Die Methylierung an H3K27 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung, beispielsweise bei der Regulation der Hox-Gene, welche die anterior-posteriore Entwicklung bei Tieren kontrollieren [229]. Für Kdm6b wurde dokumentiert, dass es durch pro-inflammatorische Stimuli rapide induziert wird [230] und an den Transkriptionsstart der meisten LPS-induzierten Gene in Makrophagen rekrutiert wird [231]. Kruidenier *et al.* identifizierten einen spezifischen Kdm6-Inhibitor (GSK-J4), der die Demethylase-Aktivität von Kdm6a und Kdm6b hemmt. In LPS-stimulierten Makrophagen inhibierte GSK-J4 die Expression von 16 aus 34 induzierten Zytokinen. Dieser Effekt konnte am *TNF α* -Gen nur durch den *knockdown* von Kdm6a und Kdm6b erreicht werden [232]. Viele der untersuchten Zielgene hatten überraschenderweise kein detektierbares H3K27me3 Signal [231, 232]. In den durchgeführten ChIP-Analysen konnte Kdm6a an den *IL8* und *CXCL2* Loci in IL-1-stimulierten KB-Zellen mit dem verwendeten Antikörper nicht detektiert werden (Abb.26). Auch hier ist kein Signal für H3K27me3 messbar (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung des mittlerweile kommerziellen Inhibitors wäre auch in diesem System hoch interessant und könnte die Effekte des *knockdowns* validieren. Kdm6a ist außerdem eine spezifische Untereinheit des MLL3/MLL4/Trr-Komplexes [233], welcher als Methyltransferase für die Monomethylierung an H3K4 in Enhancer-Regionen in Frage kommt [78].

Außerdem wurden zwei PAD-Proteine als ko-aktivierende Regulatoren im RNAi-Screen identifiziert (Tab.2). Peptidylarginin Deiminasen (PADs) sind Enzyme, die positiv-geladene Arginin-Reste in Proteinen Kalzium-abhängig zu neutralen Citrullin-Resten konvertieren [234]. Es wurde gezeigt, dass PADI4 unmodifizierte und monomethylierte Histon-Arginin-Reste deiminiert, was zur Repression der Transkription einiger Gene führt [235-238]. Zhang *et al.* konnten dagegen nachweisen, dass PADI4 auch ko-aktivierende Funktionen einnehmen kann. In ChIP-chip Analysen von MCF-7 Zellen zeigten sie eine Anreicherung von PADI4 und dem Transkriptionsfaktor Elk-1 nahe dem Transkriptionsstart einiger aktiver

Gene. Beispielsweise interagiert PADI4 am *c-Fos* Promotor mit Elk-1 (*ETS-like protein 1*), was nach EGF-Stimulation zur Deiminierung mit anschließender ERK-abhängiger Phosphorylierung von Elk-1, H4-Acetylierung am *c-Fos* Promotor und der Aktivierung der Transkription führt [239]. In Validierungsexperimenten zeigten alle gemessenen IL-1 Zielgene eine reduzierte Expression im *Padi4-knockdown*, während *Padi2* sehr variable Effekte aufwies (Abb.22). *Padi4* ist somit ebenfalls ein interessanter Kandidat, der auch die IL-1-abhängige Expression von NF- κ B Zielgenen beeinflussen könnte. In ChIP-Experimenten konnte jedoch keine direkte Rekrutierung an die *IL8* und *CXCL2* Loci mit den verwendeten Antikörpern nachgewiesen werden (Abb.26).

HDACs und Ncor/SMRT weisen Verbindungen zu NF- κ B-regulierten Signalwegen auf, wobei sie jedoch meist Ko-Repressor-Funktionen einnehmen [240-244]. Dabei besitzt Ncor/SMRT selbst keine enzymatische Aktivität und rekrutiert die katalytische Aktivität von HDACs, um Histone zu deacetylieren [245]. Generell sind aber zunehmend auch aktivierende Funktionen der Genregulation bekannt [92, 246-250]. Genomweite Assays haben HDAC1/2 und ihre assoziierten Proteine an transkriptionell aktiven Loci lokalisiert und alternative Funktionen aufgezeigt [251], wobei ihre repressiven Funktionen auf die Balancierung zwischen Aktivierung und Reprimierung ausgeweitet wurden [252]. Im RNAi-Screen und den nachfolgenden Validierungsexperimenten zeigten Ncor2/SMRT und HDAC2 Aktivator-Funktionen für einige IL-1-induzierte Zielgene auf (Abb.22). In ChIP-Experimenten konnte mit den verwendeten Antikörpern keine Rekrutierung an die *IL8* und *CXCL2* Loci nachgewiesen werden (Abb.26).

Sin3a und Sin3b werden ebenfalls meist mit repressiven Eigenschaften als Teil von Ko-Repressor-Komplexen assoziiert. Dabei können SMRT, HDAC1 und HDAC2 ebenfalls Bestandteile des Komplexes sein [253]. Für Sin3a werden zunehmend ebenso aktivierende Eigenschaften auf die Gentranskription in Hefen, *Drosophila* und Säugerzellen nachgewiesen [120-122, 147, 148]. Der *Sin3a-knockdown* zeigte in den Validierungsexperimenten eine Reduktion der Expression vieler untersuchter IL-1 Zielgene bei einem Stimulationszeitpunkt (1 h IL-1) (Abb.22, 23A). Proteinanalysen wiesen jedoch darauf hin, dass der *knockdown* bzw. die Überexpression von Sin3a die Expression von NF- κ B p65 in der verwendeten MEF-Zelllinie (TA7) beeinflusste (Abb.24). Somit könnte es in murinen Zellen zu einer Überlagerung von direkten und indirekten Effekten kommen. Sin3a ist für das Wachstum und die Vitalität von MEFs essentiell. Deletionen resultieren in einer Akkumulation in der G2/M-Phase des Zellzyklus, verstärkter Apoptose und der De-Repression hunderter Gene, die den Zellzyklus, die DNA-Replikation/Reparatur und den Zelltod kontrollieren [117]. Wie bereits in HeLa-Zellen diskutiert, spielt p65 eine essentielle Rolle für die Aktivierung von IL-1 Zielgenen, sodass eine Reduktion der Proteinmenge

drastische Auswirkungen auf deren Expression besitzen kann. Eine kinetische Analyse in der Expression einiger IL-1-responsiver Gene in diesen MEFs zeigte, dass Gen-spezifische Effekte des Sin3a-*knockdowns* zu beobachten waren. *mCcl2* und *mCcl7* wiesen eine Verschiebung der Induktionsmaxima zu späteren IL-1 Zeitpunkten auf und führten sogar zu einer gesteigerten Expression im Sin3a-*knockdown*, während *mCxcl2*, *mCxcl1*, *mCxcl5*, *mCxcl10* und *mCcl20* zu allen Stimulationszeitpunkten reduziert exprimiert wurden (Abb.23B). In ChIP-Experimenten konnte eine bisher in der Literatur noch nicht beschriebene IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a an aktive humane und murine NF- κ B-regulierte Promotoren detektiert werden (Abb.26, 27). Dies führt zu der Annahme, dass Sin3a an den untersuchten Zielgenen eine genspezifische Funktion als Modulator der Genexpression besitzt, was im folgenden Kapitel näher diskutiert werden soll.

6.3 Sin3a reguliert IL-1-abhängig die Expression von NF- κ B Zielgenen

Als Ko-Regulator, der an aktive IL-1-induzierte Gene rekrutiert wird, stand Sin3a im Fokus der nachfolgenden Experimente. Mit Hilfe von ChIP-Experimenten konnten die Bedingungen der Rekrutierung und die Funktion von Sin3a an den Loci bestimmter Chemokingene analysiert werden. Obwohl die Ergebnisse des shRNA-Screens in MEFs erzielt wurden, wurde für ChIP-Experimente auf das humane KB und HeLa Zellsystem zurückgegriffen. ChIPs in MEF TA7 Zellen waren zwar prinzipiell durchführbar, die detektierbaren Signale für IL-1-abhängige Effekte waren jedoch relativ niedrig (Abb.27). Es gab Hinweise darauf, dass innerhalb der MEF Population einzelne Zellen eine sehr starke IL-1 Antwort zeigen, während der Großteil der Population nur schwach oder gar nicht antwortet (Masterthesis Juliane Kums). Da in einem ChIP-Experiment die gesamte Zellpopulation analysiert wird, werden diese starken Einzelzellantworten überlagert. Alternative MEF-Zelllinien (MK2/5 und p65 wt/KO) zeigten deutlich stärkere IL-1-abhängige Signale (Abb.27, 41B), waren jedoch nur schwer transfizierbar, sodass eine Manipulation z.B. durch *knockdown* der beteiligten Proteine mit ausreichenden Zellmengen nur schwer realisierbar war (Daten nicht gezeigt). Für KB-Zellen existierten innerhalb der Arbeitsgruppe bereits umfangreiche ChIP-seq Profile für beteiligte Transkriptionsfaktoren, die RNA-Polymerase und einige Histonmodifikationen (Dissertation Liane Jurida) unter verschiedenen Behandlungsbedingungen. Außerdem weisen KB-Zellen auch auf Einzelzelebene eine sehr starke und gleichmäßige IL-1 Antwort auf [177]. Im Gegensatz zu KB-Zellen, die nur schwer genetisch manipulierbar sind, boten HeLa-Zellen den Vorteil einer guten Transfizierbarkeit mit hohen *knockdown*-Effizienzen. Die Antwort auf IL-1 war ebenfalls stark und die Population ausreichend gleichmäßig. Primer-Paare, die anhand von ChIP-seq Profilen in KB-Zellen generiert wurden, waren auch auf das HeLa-Zellsystem anwendbar (Abb.7). Sowohl in KB- als auch in HeLa-Zellen konnte eine IL-

IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a an die Promotoren von *IL8* und *CXCL2* detektiert werden, jedoch nicht an die regulatorischen Enhancer-Regionen (Abb.26, 41A). Am *mCcl2*-Locus in MEFs zeigte sich sogar eine räumliche Trennung zwischen dem Promotor, welcher eine Sin3a und RNA-Pol II Rekrutierung aufwies, und dem Enhancer, an den p65 nach IL-1 Stimulation gebunden hatte (Abb.27). Sin3a scheint somit keine Funktion an weiter *upstream* gelegenen regulatorischen Elementen für die Transkription der untersuchten Gene einzunehmen, sondern wird spezifisch am Ort der Transkription benötigt. In der aktuellen Literatur sind nur wenige Hinweise einer Sin3a Rekrutierung an regulatorische Enhancer-Strukturen gegeben. Beispielsweise wiesen Solaimani *et al.* eine induzierte Rekrutierung von Sin3a als Aktivator an den *Cyp1a1* Promotor und Enhancer in Hepa-1 Mauszellen nach [122].

Analog zur p65-Analyse wurden die apikalen Signalwege, welche an der Sin3a Rekrutierung beteiligt sind, untersucht. Dabei zeigte sich auch hier eine Abhängigkeit von den zytosolischen Kinasen TAK1 und IKK2 (Abb.28, 29). Die Unterbrechung des kanonischen IL-1-Signalwegs durch Hemmung dieser beiden zentralen Kinasen blockierte alle beobachteten IL-1-abhängigen Effekte an den *IL8* und *CXCL2* Loci inklusive der Sin3a Rekrutierung.

ChIP-seq Experimente boten die Möglichkeit genomweite Aussagen für die Sin3a Rekrutierung unter den gewählten Bedingungen zu treffen. Bioinformatische Analysen der Daten zeigten, dass Sin3a eine starke Überlappung mit der aktiven RNA-Polymerase II (P(S5)-Pol II) aufwies. Dabei zeigten 81% der Sin3a Peaks auch einen P(S5)-Pol II Peak auf (Abb.31B). Es konnte eine Gruppe an IL-1-induzierbaren Sin3a Peaks identifiziert werden, deren Sin3a Bindung durch 5Z-7-Oxozeaenol gehemmt wurde und eine ebenso regulierte Bindung von P(S5)-Pol II aufwies (Abb.32, 37). Die genomweite Verteilung der Sin3a Peaks zeigte, dass es hauptsächlich an die TSSs, Exone und TESs rekrutiert wird (Abb.33). An IL-1-induzierten Genen war eine starke Zunahme der Bindungen von Sin3a und P(S5)-Pol II an diesen Elementen zu beobachten (Abb.34). Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen der Sin3a/P(S5)-Pol II Bindung und der Genexpressionsstärke gezeigt werden (Abb.35, 36). Anhand des CXC-Clusters auf Chromosom 4 konnten die Bindungen unter anderem an den beiden prototypischen IL-1 Zielgenen *IL8* und *CXCL2* näher charakterisiert werden (Abb.38). Sin3a und P(S5)-Pol II zeigten eine IL-1-abhängige Rekrutierung an alle aktivierten Gene (*IL8*, *CXCL1*, *CXCL3* und *CXCL2*). Stillgelegte Gene wie *CXCL6* und *CXCL5* und die Enhancer-Regionen wiesen dagegen keine Rekrutierung von Sin3a oder P(S5)-Pol II auf. Auch hier waren alle Rekrutierungsereignisse von TAK1 abhängig. An *IL8* und *CXCL2* konnte die Überlappung der IL-1-abhängigen Signale von Sin3a und P(S5)-Pol II über den gesamten Genkörpern verdeutlicht werden (Abb.38). Im Vergleich zu P(S5)-Pol II zeigte die RNA-Pol II in allen Analysen eine schwächere Überlappung mit Sin3a auf, wobei die

Tendenzen der Regulation und Verteilung ähnlich waren. Dies könnte an der geringeren Effizienz des RNA-Pol II Antikörpers in der ChIP liegen, sodass schwächere Peaks im Hintergrund verschwinden. Sowohl die genomweiten Analysen, als auch die Fokussierung auf IL-1-induzierte Gene weisen auf einen Sin3a-assoziierten RNA-Polymerase-Komplex hin, der an stark exprimierte Gene bindet und sich während der Transkription über das Gen bewegt.

Eine kinetische Analyse der Bindungsereignisse von p65, aktiver RNA-Pol II und Sin3a an den *IL8* und *CXCL2* Promotoren wies darauf hin, dass alle drei Faktoren relativ zeitgleich nach einer IL-1 Stimulation rekrutiert wurden, wobei Sin3a eine etwas frühere und andauernde Rekrutierung zeigte (Abb.40). Anschließend wurden die Abhängigkeiten der drei Faktoren genauer untersucht. Dabei bestätigte sich die Rolle von p65 als Masterregulator für alle nachfolgenden Rekrutierungsereignisse. Analog zu den untersuchten AP-1 Faktoren und der RNA-Polymerase II ist auch die Rekrutierung von Sin3a von der p65-Präsenz abhängig (Abb.41, 42). Der Verlust von Sin3a hatte dagegen nur mäßige Auswirkungen auf die IL-1-abhängige Bindung von p65 und RNA-Pol II, führte jedoch zu einem erheblichen Anstieg der Transkription von *IL8* und *CXCL2* (Abb.43). Die *knockdown*-Daten in HeLa Zellen weisen ebenfalls darauf hin, dass Sin3a eine Modulator-Funktion als *shaping factor* einnimmt. Dabei wird die Induktion der Zielgene *IL8* und *CXCL2* nicht blockiert, sondern eine für die Zelle unphysiologische, überschießende Transkription vermieden und die Rückregulation zu einem basalen Niveau gesteuert. Für Sin3b konnten Jelinic *et al.* einen zu *S.cerevisiae* homologen Komplex in Säugern identifizieren, der *downstream* der TSS von transkribierten Genen bindet und das Fortschreiten der RNA-Pol II drosselt. HDAC1 als katalytische Untereinheit des Komplexes reguliert den Grad der Histon-Acetylierung und damit die Transkription, während die Chromodomänen der Komplex-Untereinheit Mrg15 an H3K36me3 am Ende der transkribierten Region binden. Eine Inaktivierung der Komplex-Untereinheiten förderte das Fortschreiten der RNA-Pol II und führte zu einer gesteigerten Transkription [254]. Analog zu den Effekten des Sin3a-*knockdowns* in dieser Arbeit, wurde für Sin3b somit eine „*fine-tuning*“ Funktion zugeordnet.

Sin3a, welches selbst kein bekanntes DNA-Bindemotiv und intrinsische enzymatische Aktivität besitzt, übt seine Funktion über die Fähigkeit verschiedenste Proteine zu binden und spezialisierte Komplexe zu formen aus [118]. Dadurch bringt Sin3a Chromatin-remodellierende Faktoren z.B. HDACs und Histon-Methylasen/Demethylasen, andere spezialisierte Enzyme (z.B. OGT (*O-linked N-acetylglucosamine transferase*)) und zahlreiche Transkriptionsfaktoren (p53, Rb, E2F, SMAR1, REST/NRSF) zusammen, welche die Chromatin-Struktur reorganisieren und die transkriptionelle Aktivität regulieren [118, 120, 121]. Dies ermöglicht eine enorme Komplexität von Interaktionen und Funktionen, die sich

gen- und zelltypspezifisch sowohl aktivierend, als auch reprimierend auswirken können. In dieser Arbeit sprechen sowohl die genomweiten ChIP-seq Analysen, als auch die Sin3a-*knockdown* Ergebnisse für eine Interaktion zwischen Sin3a und der aktiven RNA-Polymerase II. Eine Überexpression von mSin3a-MYC zeigte in ChIP-Experimenten dagegen kaum Veränderungen der Bindungen von Sin3a, p65 und RNA-Pol II. Die exogene Zugabe reduzierte zwar die Expression der RNA-Pol II, hemmte die Transkription der Zielgene jedoch nur leicht (Abb.45). Um den Einfluss der RNA-Pol II auf Sin3a genauer zu untersuchen, wurden RNA-Pol II Inhibitorversuche durchgeführt (Abschnitt 5.4.5). Die Behandlung mit Actinomycin D blockierte komplett die Bindung von p65 am *IL8* Locus und in der Folge auch alle weiteren Ereignisse (Abb.46). Vergleichbar mit einem p65-*knockdown* führte dies zum erwarteten Verlust der RNA-Pol II und der Sin3a Bindung. Eine Degradation der RNA-Pol II durch die Behandlung mit α -Amanitin (Abb.48) und die Hemmung ihrer Aktivität durch DRB (Abb.47) zeigten, dass die Sin3a Rekrutierung nicht nur von der Bindung der Polymerase, sondern auch von ihrer Aktivität abhängt. Außerdem konnte eine IL-1-unabhängige, endogene Bindung zwischen RNA-Pol II und Sin3a in HeLa Zellen nachgewiesen werden. Dabei ko-immunopräzipitierte nur eine geringe Menge RNA-Pol II in der Sin3a-IP, während durch Präzipitation von RNA-Pol II kein Sin3a ko-immunopräzipitiert werden konnte (Abb.53). Dies spricht dafür, dass nur eine kleine Fraktion der Gesamt-RNA-Pol II Moleküle der Zelle zu diesem Zeitpunkt stabil mit Sin3a assoziiert war. Mittlerweile wird angenommen, dass die Komponenten des Präinitiationskomplexes (PIC) nicht fest zusammengestellt sind, sondern dass verschiedene Klassen von PICs existieren, wodurch eine ungeahnte zelltyp-und genspezifische Diversität geschaffen wird [203, 255]. Für die hier untersuchten Chemokingene ist ein Stimulus (IL-1)-induzierter PIC denkbar, der sich unter anderem aus Sin3a und assoziierten Ko-Regulatoren zusammensetzt. In der Literatur ist eine direkte Verbindung zwischen Sin3a und der RNA-Polymerase über die O-GlcNAc Transferase (OGT) bekannt [134, 256, 257]. Viele Transkriptionsfaktoren, Histone und die RNA Polymerase II können durch O-verknüpfte N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) Monosaccharide an Serin und Threonin-Resten modifiziert werden, was durch OGT katalysiert wird [258]. Die C-terminale Domäne (CTD) der größten RNA-Pol II Untereinheit kann durch mehrere O-GlcNAc-Reste modifiziert werden, was zu einem Arrest der transkriptionellen Elongation führt [256]. Yang *et al.* konnten zeigen, dass OGT mit Sin3a über dessen PAH4-Domäne interagiert und an Promotoren rekrutiert wird, um die Transkription zu reprimieren [134]. Es gibt Hinweise darauf, dass OGT für das Recyclen der Polymerase während der Transkription benötigt wird. Die CTD ist während der Initiation der Transkription dephosphoryliert und O-GlcN-acetyliert und wird während der Elongation phosphoryliert und die O-GlcNAc-Modifikation entfernt [259]. An einem aktiv transkribierten Gen wird dieser Zyklus aufrechterhalten, indem OGT und eine CTD Phosphatase kooperativ

am Recyclen der Polymerase nach einer Transkriptionsrunde arbeiten. Sin3a könnte über OGT die Polymerase auf einer Seite dieses Zyklus blockieren, sodass es zur Repression der Transkription kommt [134]. p65 wird ebenfalls durch OGT modifiziert [260-262]. Einige Studien besagen, dass diese Modifikation pro-inflammatorisch wirkt [2, 261], andere konnten eine anti-inflammatorische Wirkung aufzeigen [262-264]. Allison *et al.* beobachteten, dass die O-GlcNAc Modifikation den Glukose-Metabolismus mit der p300-abhängigen Acetylierung von p65 an K310 und somit der Transkription verknüpft. Ein *knockdown* von OGT in HEK293T Zellen führte zu einer reduzierten Expression von *IL8* nach einer Stimulation mit TNF. Außerdem konnten sie mittels ChIP eine Ko-Lokalisation von p65, p300 und OGT am *IL8* Promotor nachweisen [2]. Eine direkte Interaktion zwischen p65 und Sin3a konnte nur im Überexpressionssystem gezeigt werden (Abb.51, 52, 53). Dabei wurde die PAH4-Domäne von Sin3a für die Interaktion mit p65 benötigt (Abb.51, 52). Durch seine sechs konservierten Domänen (PAH1-4, HID und HCR) interagiert Sin3a mit einer großen Zahl an unterschiedlichen Proteinen [120]. Dazu binden PAH1 und 2 hauptsächlich an Transkriptionsfaktoren, während PAH3, 4 und HID als Andockstellen für andere Komplex-Untereinheiten dienen [118]. Die PAH1-3 Domänen bilden vorgefaltete Bindemodule, ähnlich einer Perlenkette, aus [265]. Im Gegensatz dazu bildet PAH4 kein 4-Helix-Bündel, sondern weist eine alternative Faltung auf [266]. Sin3a könnte als Plattform für die RNA-Pol II, NF- κ B p65 und weitere assoziierte Faktoren z.B. OGT dienen, um seine Funktion auf die Gentranskription von induzierten IL-1 Zielgenen auszuüben.

Häufig werden HDAC1 und 2 als katalytische Untereinheit mit Sin3a-Repressorkomplexen in Verbindung gebracht [267]. Der Sin3/HDAC-Komplex deacetyliert H3 und H4, was in dynamischer Kombination mit Methylierung/Demethylierung von Lysin-Resten zur Sin3a-vermittelten Genrepression führt [120]. Es werden aber auch Nicht-Histonproteine durch Sin3/HDAC deacetyliert. Icarda *et al.*, konnten eine Deacetylierung von STAT3 durch den Sin3a/HDAC-Komplex zeigen. Dies war für die STAT3-vermittelte Repression von Zielgenen essentiell [268]. In dieser Arbeit konnte durch die Hemmung der Aktivität von Klasse I und II HDACs mit TSA gezeigt werden, dass ihre Aktivität für die Rekrutierung von Sin3a an *IL8* und *CXCL2* nicht benötigt wird. Außerdem führte dies zu keiner gesteigerten Genexpression (Abb.30), was gegen eine Sin3a-HDAC vermittelte Dämpfung der Gentranskription spricht. Eine direkte Detektion von HDAC1 (Daten nicht gezeigt) und 2 (Abb.26, Daten mit alternativen Antikörpern nicht gezeigt) an den untersuchten Loci war mit den verwendeten Antikörpern nicht möglich. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass die transkriptionelle Regulation durch Sin3a auch unabhängig von Histondeacetylierungen stattfinden kann [134, 136, 155, 269]. Beispielsweise besitzen die *knockdowns* von HDACs und Sin3a gegenteilige Effekte auf die Acetylierung von H3 und H4 [150] und zeigen nur einen geringen *Overlap* in

Genexpressionsanalysen [270], wobei Sin3a eine große Zahl an positiven Regulationen aufweist [127].

Chromatin-assoziierte Proteine und posttranslationale Modifikationen von Histonen spielen eine wichtige Rolle für die transkriptionelle Kontrolle in der normalen Entwicklung von Zellen. Veränderungen dieser beteiligten Prozesse können in verschiedenen Krankheiten und der Entstehung von Krebs resultieren [271]. Aktuelle Studien, die eine neue Klasse an spezifischen Inhibitoren gegen verschiedene Chromatin-assoziierte Proteine verwenden, sind vielversprechend für neue Therapieansätze. Ziel dieser „*epigenetic drugs*“ sind beispielsweise Histon-Methyltransferasen, Histon-Demethylasen und Proteine deren Domänen (z.B. Bromo-, Chromo-, Tudor-Domänen) spezifische Histonmodifikationen erkennen [271]. Proteine mit Bromodomänen erkennen und binden an acetylierte Lysine von Histonenden, sodass sie eine Lesefunktion für den Histoncode einnehmen. Dabei fungieren sie als Gerüstproteine für den Aufbau von großen Multiproteinkomplexen, welche die Zugänglichkeit des Chromatins regulieren, und sie werden für die Rekrutierung von Schlüsselkomponenten der Transkriptions-Maschinerie, wie z.B. der RNA-Pol II, benötigt [271]. Proteine der BET-(*bromodomain and extraterminal domain*) Familie (z.B. Brd2,3,4 und T) können gezielt durch kleine molekulare Antagonisten inhibiert werden [272, 273], wodurch der Aufbau eines aktiven Transkriptions-Komplexes inhibiert wird. JQ1 und IBET151 zeigten anti-proliferative Aktivitäten bei verschiedenen Blutkrebsarten, indem sie z.B. die Expression des Onkogens MYC inhibierten [274, 275]. Brown *et al.* konnten mithilfe des JQ1-Inhibitors vor kurzem zeigen, dass BRD4 durch NF- κ B p65 zu TNF α -stimulierten Super-Enhancern rekrutiert wird und die Expression proximaler inflammatorischer Gene in Endothelzellen reguliert [276]. Durch die Verwendung dieser Inhibitoren könnte auch die Rolle von Sin3a im Pol II-Kontext weiter charakterisiert werden. Erste Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass JQ1 die IL-1-induzierte *IL8* Expression hemmen kann (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnten im Verlauf dieser Arbeit die komplexen Mechanismen der nukleären Genregulation in der Entzündungsantwort von Epithelzellen weiter charakterisiert werden. Dabei wurde die Funktion von p65 als Masterregulator an IL-1-induzierten Chemokinen weiter aufgeklärt. p65 war nicht nur essentiell für die Rekrutierung von allen untersuchten Chromatinfaktoren an die untersuchten Promotoren und regulatorischen Enhancer, sondern führte auch zur Aktivierung von bereits vormarkierten Enhancer-Strukturen, insbesondere indem die H3K27 Acetylierung weiter gesteigert wurde. Außerdem wurden durch einen gezielten shRNA-Screen neue potentielle Ko-Regulatoren des nukleären IL-1 Signalwegs identifiziert. Dazu konnte erstmals eine TAK1/IKK2/p65-abhängige Rekrutierung von Sin3a an IL-1-induzierte NF- κ B Zielgene in humanen Epithelzellen und murinen embryonalen Fibroblasten gezeigt werden. Die Funktion von Sin3a und die

molekularen Mechanismen der Rekrutierung wurden im Laufe dieser Arbeit ausführlich untersucht. Es gab Hinweise darauf, dass Sin3a eine gen- und zelltypspezifische Rolle als eine Art Modulator oder *shaping factor* einnimmt, um die Transkription von Chemokinen zu regulieren, um gegebenenfalls eine überschießende Expression zu verhindern oder eine De-Regulation zu einem basalen Expressionsniveau zu kontrollieren. Dies könnte durch die Formierung von Stimulus (IL-1)-spezifischen RNA-Pol II-Komplexen in Assoziation mit Sin3a und NF- κ B p65 an den untersuchten Chemokingenen geschehen. Der Mechanismus der Regulation von Sin3-Komplexen selbst ist immer noch weitgehend ungeklärt [120]. Vermutlich spielen post-translationale Modifikationen eine bedeutende Rolle. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte durch eine phospho-proteomweite massenspektrometrische Analyse in HeLa-Zellen eine IL-1-abhängige Phosphorylierung von Sin3a an S277/T284 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Modifikation könnte für IL-1-spezifische Funktionen und Interaktionen von Sin3a in Frage kommen. Durch die Generierung eines spezifischen Phospho-Sin3a Antikörpers und die Verwendung von inaktivierenden bzw. phosphomimetischen Mutationen dieser Phosphorylierungsstellen kann der Mechanismus der IL-1-abhängigen Rekrutierung von Sin3a in zukünftigen Experimenten weiter analysiert werden. Abbildung 5 fasst die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu den IL-1-regulierten Chromatinfaktoren und -prozessen zusammen.

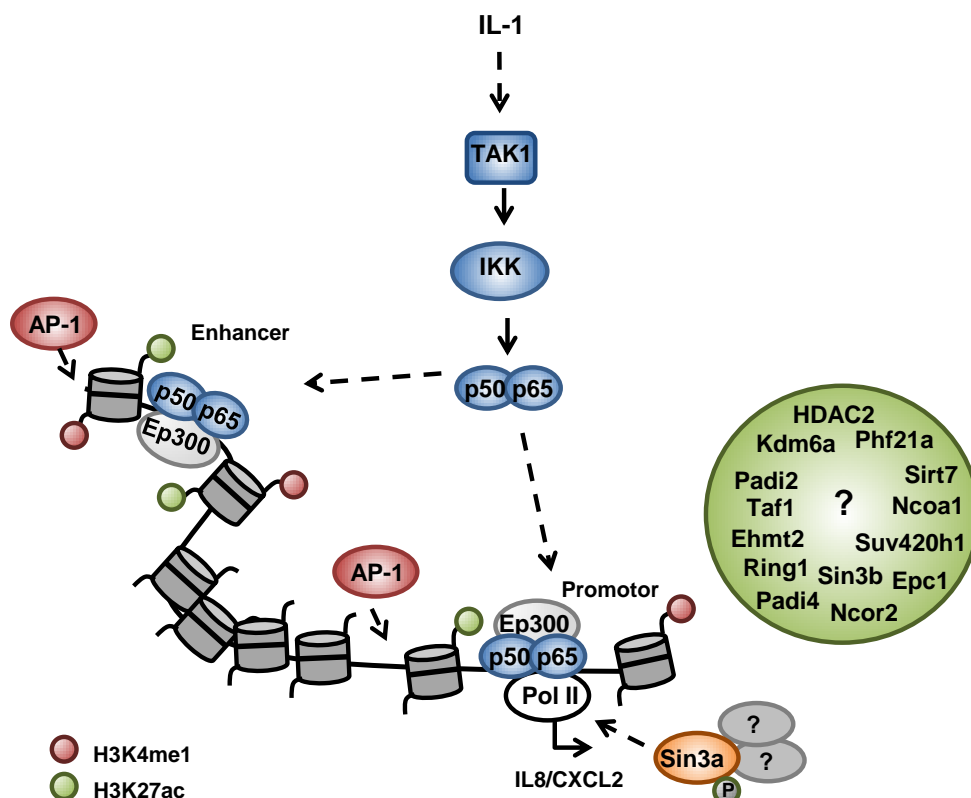


Abbildung 55: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit charakterisierten molekularen Mechanismen der Chromatin-abhängigen Regulation inflammatorischer Gene. NF- κ B p65 konnte als Masterregulator der IL-1-induzierten Chemokine *IL8* und *CXCL2* definiert werden. Dabei ist

p65 für die Aktivierung von regulatorischen Enhancern und die Rekrutierung weiterer Faktoren essentiell. Die Bindung von p65 und alle nachfolgenden Bindungsereignisse und Chromatin-Veränderungen hängen von den zytoplasmatischen Kinasen TAK1 und IKK2 ab. Mittels eines shRNA-Screens konnten 16 neue potentielle nukleäre Ko-Regulatoren des IL-1 Signalwegs identifiziert werden. Darunter konnte die Rekrutierung von Ep300 an die untersuchten Loci mittels ChIP bestätigt und ein neuer Ko-Regulator, Sin3a, validiert werden. Sin3a wird ebenfalls TAK1/IKK2/p65-abhängig an die untersuchten aktivierten Gene rekrutiert. Dort dient Sin3a vermutlich, in enger Assoziation mit p65 und vor allem der aktiven RNA-Pol II, der Modulation der Gentranskription.

Wie zu Beginn ausführlich beschrieben, spielen Zytokine der IL-1 Familie eine wichtige Rolle in pathophysiologischen Prozessen, die bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Tumoren beteiligt sind. Die in dieser Arbeit charakterisierten neuen Faktoren, welche in den Zytokin-Signalwegen regulatorische Schlüsselrollen einnehmen, können zukünftig als Ziele von innovativen, auf Chromatinprozesse ausgerichteten, therapeutischen Ansätzen dienen.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
2. Allison, D.F., et al., *Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF-kappaB acetylation and transcription*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2012. **109**(42): p. 16888-16893.
3. Schmitz, M.L., et al., *Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(12): p. 2165-75.
4. Barboric, M., et al., *NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II*. Mol.Cell, 2001. **8**(2): p. 327-337.
5. Amir-Zilberstein, L., et al., *Differential regulation of NF-kappaB by elongation factors is determined by core promoter type*. Mol.Cell Biol., 2007. **27**(14): p. 5246-5259.
6. Dinarello, C.A., *IL-1: discoveries, controversies and future directions*. Eur J Immunol, 2010. **40**(3): p. 599-606.
7. Dinarello, C.A., *Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 519-50.
8. Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani, *The interleukin-1 family: back to the future*. Immunity, 2013. **39**(6): p. 1003-18.
9. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 89-102.
10. Rider, P., et al., *IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation*. J Immunol, 2011. **187**(9): p. 4835-43.
11. Kurt-Jones, E.A., et al., *Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(4): p. 1204-8.
12. Chen, C.J., et al., *Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells*. Nat Med, 2007. **13**(7): p. 851-6.
13. Weber, A., P. Wasiliew, and M. Kracht, *Interleukin-1 (IL-1) pathway*. Sci Signal, 2010. **3**(105): p. cm1.
14. Hoffmann, E., et al., *Multiple control of interleukin-8 gene expression*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(5): p. 847-55.
15. Casadio, R., et al., *Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex*. FEBS Lett, 2001. **499**(1-2): p. 65-8.
16. Bouwmeester, T., et al., *A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway*. Nat.Cell Biol., 2004. **6**(2): p. 97-105.
17. Chen, F.E., et al., *Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 410-413.
18. Chen, Y.Q., S. Ghosh, and G. Ghosh, *A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer*. Nat.Struct.Biol., 1998. **5**(1): p. 67-73.
19. Chen, Y.L., et al., *Transcriptional regulation of tristetraprolin by NF-kappaB signaling in LPS-stimulated macrophages*. Mol.Biol.Rep., 2013. **40**(4): p. 2867-2877.
20. Sakurai, H., et al., *Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1*. FEBS Lett, 2000. **474**(2-3): p. 141-5.
21. Chew, J., et al., *WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling*. Nat.Cell Biol., 2009. **11**(5): p. 659-666.
22. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
23. Rothwarf, D.M., et al., *IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 297-300.

24. Zandi, E., et al., *The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation*. Cell, 1997. **91**(2): p. 243-52.
25. Zandi, E., Y. Chen, and M. Karin, *Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1360-3.
26. Gewurz, B.E., et al., *Genome-wide siRNA screen for mediators of NF-kappaB activation*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2012. **109**(7): p. 2467-2472.
27. Gilmore, T.D. and F.S. Wolenski, *NF-kappaB: where did it come from and why?* Immunol.Rev., 2012. **246**(1): p. 14-35.
28. Schmitz, M.L., et al., *Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF-kappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7219-26.
29. Holtmann, H., et al., *The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3508-16.
30. Finch, A., et al., *Selective activation of JNK/SAPK by interleukin-1 in rabbit liver is mediated by MKK7*. FEBS Lett, 1997. **418**(1-2): p. 144-8.
31. Tournier, C., et al., *MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1419-26.
32. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update*. Physiol Rev, 2012. **92**(2): p. 689-737.
33. Huang, D.B., et al., *Crystal structure of NF-kappaB (p50)2 complexed to a high-affinity RNA aptamer*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2003. **100**(16): p. 9268-9273.
34. Sacconi, S., S. Pantano, and G. Natoli, *p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment*. Nat.Immunol., 2002. **3**(1): p. 69-75.
35. Vermeulen, L., et al., *Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)*. EMBO J, 2003. **22**(6): p. 1313-24.
36. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 859-68.
37. Kracht, M., *Targeting Strategies to Modulate the NF-kB and JNK Signal Transduction Network*. 2007.
38. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi, *AP-1 function and regulation*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 240-6.
39. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death*. Nat.Cell Biol., 2002. **4**(5): p. E131-E136.
40. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. Nat.Rev.Cancer, 2003. **3**(11): p. 859-868.
41. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh, *Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6706-6716.
42. Gasparini, C. and M. Feldmann, *NF-kappaB as a target for modulating inflammatory responses*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(35): p. 5735-45.
43. Huxford, T., S. Malek, and G. Ghosh, *Structure and mechanism in NF-kappa B/I kappa B signaling*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 533-40.
44. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
45. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp, *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
46. Schmitz, M.L., et al., *Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF-kappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators*. J.Biol.Chem., 1995. **270**(13): p. 7219-7226.
47. Blair, W.S., et al., *Mutational analysis of the transcription activation domain of RelA: identification of a highly synergistic minimal acidic activation module*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(11): p. 7226-34.

48. Perkins, N.D., et al., *Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator*. Science, 1997. **275**(5299): p. 523-7.
49. Sheppard, K.A., et al., *Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 6367-78.
50. Chen, L.F. and W.C. Greene, *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 392-401.
51. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
52. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
53. Derudder, E., et al., *RelB/p50 dimers are differentially regulated by tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin-beta receptor activation: critical roles for p100*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23278-84.
54. Basak, S., et al., *A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module*. Cell, 2007. **128**(2): p. 369-81.
55. Constantin, G., et al., *Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow*. Immunity, 2000. **13**(6): p. 759-69.
56. Groom, J.R., et al., *CXCR3 chemokine receptor-ligand interactions in the lymph node optimize CD4+ T helper 1 cell differentiation*. Immunity, 2012. **37**(6): p. 1091-103.
57. Bosisio, D., et al., *Angiogenic and antiangiogenic chemokines*. Chem Immunol Allergy, 2014. **99**: p. 89-104.
58. Roy, I., D.B. Evans, and M.B. Dwinell, *Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician*. Surgery, 2014. **155**(6): p. 961-73.
59. Nomiyama, H., N. Osada, and O. Yoshie, *Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history*. Genes Cells, 2013. **18**(1): p. 1-16.
60. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
61. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.
62. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 129-34.
63. Colobran, R., et al., *The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity*. Clin Exp Immunol, 2007. **148**(2): p. 208-17.
64. DeVries, M.E., et al., *Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system*. J Immunol, 2006. **176**(1): p. 401-15.
65. Baggiolini, M., *Chemokines in pathology and medicine*. J Intern Med, 2001. **250**(2): p. 91-104.
66. Sarmiento, J., et al., *Diverging mechanisms of activation of chemokine receptors revealed by novel chemokine agonists*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e27967.
67. Hammond, M.E., et al., *IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1428-33.
68. Das, S.T., et al., *Monomeric and dimeric CXCL8 are both essential for in vivo neutrophil recruitment*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11754.
69. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
70. Sparmann, A. and D. Bar-Sagi, *Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis*. Cancer Cell, 2004. **6**(5): p. 447-58.
71. Sparmann, A. and D. Bar-Sagi, *Ras oncogene and inflammation: partners in crime*. Cell Cycle, 2005. **4**(6): p. 735-6.
72. Smale, S.T., *Hierarchies of NF-kappaB target-gene regulation*. Nat.Immunol., 2011. **12**(8): p. 689-694.
73. Ghisletti, S., et al., *Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages*. Immunity., 2010. **32**(3): p. 317-328.

74. Heinz, S., et al., *Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities*. Mol Cell, 2010. **38**(4): p. 576-89.
75. Bulger, M. and M. Groudine, *Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers*. Cell, 2011. **144**(3): p. 327-39.
76. Heintzman, N.D., et al., *Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome*. Nat.Genet., 2007. **39**(3): p. 311-318.
77. Rogatsky, I. and K. Adelman, *Preparing the First Responders: Building the Inflammatory Transcriptome from the Ground Up*. Mol.Cell, 2014. **54**(2): p. 245-254.
78. Calo, E. and J. Wysocka, *Modification of enhancer chromatin: what, how, and why?* Mol.Cell, 2013. **49**(5): p. 825-837.
79. Xu, J., et al., *Pioneer factor interactions and unmethylated CpG dinucleotides mark silent tissue-specific enhancers in embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12377-82.
80. Xu, J., et al., *Transcriptional competence and the active marking of tissue-specific enhancers by defined transcription factors in embryonic and induced pluripotent stem cells*. Genes Dev, 2009. **23**(24): p. 2824-38.
81. Sacconi, S. and G. Natoli, *Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes*. Genes Dev., 2002. **16**(17): p. 2219-2224.
82. De Santa, F., et al., *The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1083-1094.
83. van, E.D., Y. Zhu, and S. Sacconi, *A feed-forward circuit controlling inducible NF-kappaB target gene activation by promoter histone demethylation*. Mol.Cell, 2010. **39**(5): p. 750-760.
84. Ramirez-Carrozzi, V.R., et al., *A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling*. Cell, 2009. **138**(1): p. 114-128.
85. Creighton, M.P., et al., *Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21931-6.
86. Yamamoto, Y., et al., *Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 655-9.
87. Sen, R. and D. Baltimore, *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.
88. Natoli, G., et al., *Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time*. Nat.Immunol., 2005. **6**(5): p. 439-445.
89. Udalova, I.A., et al., *Quantitative prediction of NF-kappa B DNA-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8167-72.
90. Hoffmann, A., T.H. Leung, and D. Baltimore, *Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities*. EMBO J, 2003. **22**(20): p. 5530-9.
91. Sacconi, S., S. Pantano, and G. Natoli, *Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers*. Mol.Cell, 2003. **11**(6): p. 1563-1574.
92. Ziesche, E., et al., *The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF-kappaB*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(1): p. 90-109.
93. Huang, B., et al., *Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway*. Cell Signal., 2010. **22**(9): p. 1282-1290.
94. Sakurai, H., et al., *IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30353-6.
95. Mattioli, I., et al., *Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6175-83.
96. Mattioli, I., et al., *Transient and selective NF-kappa B p65 serine 536 phosphorylation induced by T cell costimulation is mediated by I kappa B kinase beta and controls the kinetics of p65 nuclear import*. J.Immunol., 2004. **172**(10): p. 6336-6344.
97. Bohuslav, J., et al., *p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(25): p. 26115-25.

98. Buss, H., et al., *Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- κ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I κ B kinase (IKK)- α , IKK β , IKK ϵ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription.* J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55633-43.
99. Buss, H., et al., *Cyclin-dependent kinase 6 phosphorylates NF- κ B P65 at serine 536 and contributes to the regulation of inflammatory gene expression.* PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51847.
100. Handschick, K., et al., *Cyclin-dependent kinase 6 is a chromatin-bound cofactor for NF- κ B-dependent gene expression.* Mol Cell, 2014. **53**(2): p. 193-208.
101. Zhong, H., R.E. Voll, and S. Ghosh, *Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300.* Mol Cell, 1998. **1**(5): p. 661-71.
102. Zeng, L. and M.M. Zhou, *Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain.* FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 124-8.
103. Huang, B., et al., *Brd4 coactivates transcriptional activation of NF- κ B via specific binding to acetylated RelA.* Mol.Cell Biol., 2009. **29**(5): p. 1375-1387.
104. Chen, L., et al., *Duration of nuclear NF- κ B action regulated by reversible acetylation.* Science, 2001. **293**(5535): p. 1653-7.
105. Kiernan, R., et al., *Post-activation turn-off of NF- κ B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65.* J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2758-66.
106. Yeung, F., et al., *Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase.* EMBO J, 2004. **23**(12): p. 2369-80.
107. Arenzana-Seisdedos, F., et al., *Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm.* J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 3): p. 369-78.
108. Tanaka, T., M.J. Grusby, and T. Kaisho, *PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF- κ B activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit.* Nat.Immunol., 2007. **8**(6): p. 584-591.
109. Ryo, A., et al., *Regulation of NF- κ B signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA.* Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1413-26.
110. Maine, G.N., et al., *COMMD1 promotes the ubiquitination of NF- κ B subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase.* EMBO J, 2007. **26**(2): p. 436-47.
111. Natoli, G. and S. Chiocca, *Nuclear ubiquitin ligases, NF- κ B degradation, and the control of inflammation.* Sci.Signal., 2008. **1**(1): p. e1.
112. Sacconi, S., et al., *Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor κ B response.* J.Exp.Med., 2004. **200**(1): p. 107-113.
113. Wan, F. and M.J. Lenardo, *The nuclear signaling of NF- κ B: current knowledge, new insights, and future perspectives.* Cell Res, 2010. **20**(1): p. 24-33.
114. Bhatt, D. and S. Ghosh, *Regulation of the NF- κ B-Mediated Transcription of Inflammatory Genes.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 71.
115. Nasmyth, K., D. Stillman, and D. Kipling, *Both positive and negative regulators of HO transcription are required for mother-cell-specific mating-type switching in yeast.* Cell, 1987. **48**(4): p. 579-87.
116. Sternberg, P.W., et al., *Activation of the yeast HO gene by release from multiple negative controls.* Cell, 1987. **48**(4): p. 567-77.
117. Dannenberg, J.H., et al., *mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival.* Genes Dev, 2005. **19**(13): p. 1581-95.
118. Grzenda, A., et al., *Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1789**(6-8): p. 443-50.
119. Heinzl, T., et al., *A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression.* Nature, 1997. **387**(6628): p. 43-48.

120. Kadamb, R., et al., *Sin3: insight into its transcription regulatory functions*. Eur J Cell Biol, 2013. **92**(8-9): p. 237-46.
121. Silverstein, R.A. and K. Ekwall, *Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability*. Curr Genet, 2005. **47**(1): p. 1-17.
122. Solaimani, P., F. Wang, and O. Hankinson, *SIN3A, generally regarded as a transcriptional repressor, is required for induction of gene transcription by the aryl hydrocarbon receptor*. J Biol Chem, 2014. **289**(48): p. 33655-62.
123. Sharma, V., et al., *Drosophila SIN3 is required at multiple stages of development*. Dev Dyn, 2008. **237**(10): p. 3040-50.
124. Ayer, D.E., Q.A. Lawrence, and R.N. Eisenman, *Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3*. Cell, 1995. **80**(5): p. 767-76.
125. Halleck, M.S., et al., *A widely distributed putative mammalian transcriptional regulator containing multiple paired amphipathic helices, with similarity to yeast SIN3*. Genomics, 1995. **26**(2): p. 403-6.
126. David, G., et al., *Specific requirement of the chromatin modifier mSin3B in cell cycle exit and cellular differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4168-72.
127. van Oevelen, C., et al., *A role for mammalian Sin3 in permanent gene silencing*. Mol Cell, 2008. **32**(3): p. 359-70.
128. van Oevelen, C., et al., *The mammalian Sin3 proteins are required for muscle development and sarcomere specification*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(24): p. 5686-97.
129. Cowley, S.M., et al., *The mSin3A chromatin-modifying complex is essential for embryogenesis and T-cell development*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 6990-7004.
130. Wang, H. and D.J. Stillman, *In vitro regulation of a SIN3-dependent DNA-binding activity by stimulatory and inhibitory factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(24): p. 9761-5.
131. Schreiber-Agus, N., et al., *An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3*. Cell, 1995. **80**(5): p. 777-86.
132. van Ingen, H., et al., *Extension of the binding motif of the Sin3 interacting domain of the Mad family proteins*. Biochemistry, 2004. **43**(1): p. 46-54.
133. Washburn, B.K. and R.E. Esposito, *Identification of the Sin3-binding site in Ume6 defines a two-step process for conversion of Ume6 from a transcriptional repressor to an activator in yeast*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2057-69.
134. Yang, X., F. Zhang, and J.E. Kudlow, *Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression*. Cell, 2002. **110**(1): p. 69-80.
135. Glass, C.K. and M.G. Rosenfeld, *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors*. Genes Dev, 2000. **14**(2): p. 121-41.
136. Laherty, C.D., et al., *Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression*. Cell, 1997. **89**(3): p. 349-56.
137. Lai, A., et al., *RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(8): p. 2918-32.
138. Zhang, Y., et al., *Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide, are components of a human Sin3 complex*. Cell, 1997. **89**(3): p. 357-64.
139. Fleischer, T.C., U.J. Yun, and D.E. Ayer, *Identification and characterization of three new components of the mSin3A corepressor complex*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(10): p. 3456-67.
140. Meehan, W.J., et al., *Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) forms complexes with retinoblastoma-binding protein 1 (RBP1) and the mSin3 histone deacetylase complex and represses transcription*. J Biol Chem, 2004. **279**(2): p. 1562-9.
141. Brehm, A., et al., *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 597-601.

142. Rampalli, S., et al., *Tumor suppressor SMAR1 mediates cyclin D1 repression by recruitment of the SIN3/histone deacetylase 1 complex*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(19): p. 8415-29.
143. Lutz, M., et al., *Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(8): p. 1707-13.
144. Bansal, N., et al., *Tumor suppressor protein p53 recruits human Sin3B/HDAC1 complex for down-regulation of its target promoters in response to genotoxic stress*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26156.
145. Kadosh, D. and K. Struhl, *Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters*. Cell, 1997. **89**(3): p. 365-71.
146. Sahu, S.C., et al., *Conserved themes in target recognition by the PAH1 and PAH2 domains of the Sin3 transcriptional corepressor*. J Mol Biol, 2008. **375**(5): p. 1444-56.
147. De Nadal, E., et al., *The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes*. Nature, 2004. **427**(6972): p. 370-4.
148. Ruiz-Roig, C., et al., *The Rpd3L HDAC complex is essential for the heat stress response in yeast*. Mol Microbiol, 2010. **76**(4): p. 1049-62.
149. Bernstein, B.E., J.K. Tong, and S.L. Schreiber, *Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13708-13.
150. Pile, L.A., E.M. Schlag, and D.A. Wassarman, *The SIN3/RPD3 deacetylase complex is essential for G(2) phase cell cycle progression and regulation of SMRTER corepressor levels*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(14): p. 4965-76.
151. Kong, Q., et al., *RNF220, an E3 ubiquitin ligase that targets Sin3B for ubiquitination*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(4): p. 708-13.
152. Ramachandran, S., et al., *A microRNA network regulates expression and biosynthesis of wild-type and DeltaF508 mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(33): p. 13362-7.
153. Ellenrieder, V., et al., *Signaling disrupts mSin3A binding to the Mad1-like Sin3-interacting domain of TIEG2, an Sp1-like repressor*. EMBO J, 2002. **21**(10): p. 2451-60.
154. Zilfou, J.T., et al., *The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasome-mediated degradation*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3974-85.
155. Das, T.K., et al., *Sin3a acts through a multi-gene module to regulate invasion in Drosophila and human tumors*. Oncogene, 2013. **32**(26): p. 3184-97.
156. Yang, W., et al., *Dissecting the complex regulation of Mad4 in glioblastoma multiforme cells*. Cancer Biol Ther, 2012. **13**(13): p. 1339-48.
157. Swaminathan, A. and L.A. Pile, *Regulation of cell proliferation and wing development by Drosophila SIN3 and String*. Mech Dev, 2010. **127**(1-2): p. 96-106.
158. Pellegrino, J., D.H. Castrillon, and G. David, *Chromatin associated Sin3A is essential for male germ cell lineage in the mouse*. Dev Biol, 2012. **369**(2): p. 349-55.
159. Garcia, S.N. and O. Pereira-Smith, *MRGing chromatin dynamics and cellular senescence*. Cell Biochem Biophys, 2008. **50**(3): p. 133-41.
160. McDonel, P., et al., *Sin3a is essential for the genome integrity and viability of pluripotent cells*. Dev Biol, 2012. **363**(1): p. 62-73.
161. Barnes, V.L., et al., *Loss of the SIN3 transcriptional corepressor results in aberrant mitochondrial function*. BMC Biochem, 2010. **11**: p. 26.
162. Pile, L.A., et al., *The SIN3 deacetylase complex represses genes encoding mitochondrial proteins: implications for the regulation of energy metabolism*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37840-8.
163. Ellison-Zelski, S.J. and E.T. Alarid, *Maximum growth and survival of estrogen receptor-alpha positive breast cancer cells requires the Sin3A transcriptional repressor*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 263.

164. McDonel, P., I. Costello, and B. Hendrich, *Keeping things quiet: roles of NuRD and Sin3 co-repressor complexes during mammalian development*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(1): p. 108-16.
165. Weiss, C., et al., *JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun*. EMBO J, 2003. **22**(14): p. 3686-95.
166. Todaro, G.J., S.R. Wolman, and H. Green, *RAPID TRANSFORMATION OF HUMAN FIBROBLASTS WITH LOW GROWTH POTENTIAL INTO ESTABLISHED CELL LINES BY SV40*. J Cell Physiol, 1963. **62**: p. 257-65.
167. Bhaskara, S., et al., *Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control*. Mol Cell, 2008. **30**(1): p. 61-72.
168. Li, H., et al., *Regulation of NF-kappaB activity by competition between RelA acetylation and ubiquitination*. Oncogene, 2012. **31**(5): p. 611-23.
169. Shi, Y., et al., *Elimination of protein kinase MK5/PRAK activity by targeted homologous recombination*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7732-41.
170. Langmead, B., *Aligning short sequencing reads with Bowtie*. Curr.Protoc.Bioinformatics., 2010. **Chapter 11**: p. Unit.
171. Langmead, B., et al., *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*. Genome Biol., 2009. **10**(3): p. R25.
172. Zhang, Y., et al., *Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS)*. Genome Biol., 2008. **9**(9): p. R137.
173. Xu, H., et al., *A signal-noise model for significance analysis of ChIP-seq with negative control*. Bioinformatics, 2010. **26**(9): p. 1199-204.
174. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol., 2004. **5**(10): p. R80.
175. Thorvaldsdottir, H., J.T. Robinson, and J.P. Mesirov, *Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration*. Brief Bioinform, 2013. **14**(2): p. 178-92.
176. Sutcliffe, E.L., et al., *Chromatin-Associated Protein Kinase C-theta Regulates an Inducible Gene Expression Program and MicroRNAs in Human T Lymphocytes*. Molecular Cell, 2011. **41**(6): p. 704-719.
177. Jurida, L., et al., *The Activation of IL-1-Induced Enhancers Depends on TAK1 Kinase Activity and NF-kappaB p65*. Cell Rep, 2015.
178. Saeed, A.I., et al., *TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis*. Biotechniques, 2003. **34**(2): p. 374-8.
179. Mbalaviele, G., et al., *A novel, highly selective, tight binding IkappaB kinase-2 (IKK-2) inhibitor: a tool to correlate IKK-2 activity to the fate and functions of the components of the nuclear factor-kappaB pathway in arthritis-relevant cells and animal models*. J.Pharmacol.Exp.Ther., 2009. **329**(1): p. 14-25.
180. Ninomiya-Tsuji, J., et al., *A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18485-90.
181. Wu, J., et al., *Mechanism and in vitro pharmacology of TAK1 inhibition by (5Z)-7-Oxozeaenol*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(3): p. 643-50.
182. Kouzarides, T., *SnapShot: Histone-modifying enzymes*. Cell, 2007. **128**(4): p. 802.
183. Bao, Y. and X. Shen, *SnapShot: chromatin remodeling complexes*. Cell, 2007. **129**(3): p. 632.
184. Root, D.E., et al., *Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library*. Nat Methods, 2006. **3**(9): p. 715-9.
185. Wolter, S., et al., *c-Jun controls histone modifications, NF-kappaB recruitment, and RNA polymerase II function to activate the ccl2 gene*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(13): p. 4407-23.
186. Kuo, M.H. and C.D. Allis, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays, 1998. **20**(8): p. 615-26.
187. Yoshida, M., S. Horinouchi, and T. Beppu, *Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function*. Bioessays, 1995. **17**(5): p. 423-30.

188. Bensaude, O., *Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity?* Transcription., 2011. **2**(3): p. 103-108.
189. Hoffmann, E., et al., *MEK1-dependent delayed expression of Fos-related antigen-1 counteracts c-Fos and p65 NF-kappaB-mediated interleukin-8 transcription in response to cytokines or growth factors.* J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9706-18.
190. Roebuck, K.A., *Regulation of interleukin-8 gene expression.* J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(5): p. 429-38.
191. Fujioka, S., et al., *NF-kappaB and AP-1 connection: mechanism of NF-kappaB-dependent regulation of AP-1 activity.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7806-19.
192. Khanjani, S., et al., *NFkappaB and AP-1 drive human myometrial IL8 expression.* Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 504952.
193. Ramirez-Carrozzi, V.R., et al., *Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2beta nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response.* Genes Dev, 2006. **20**(3): p. 282-96.
194. Sen, R. and S.T. Smale, *Selectivity of the NF-{kappa}B response.* Cold Spring Harb.Perspect.Biol., 2010. **2**(4): p. a000257.
195. Fenouil, R., et al., *CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters.* Genome Res, 2012. **22**(12): p. 2399-408.
196. Tartey, S., et al., *Akirin2 is critical for inducing inflammatory genes by bridging IkappaB-zeta and the SWI/SNF complex.* EMBO J, 2014. **33**(20): p. 2332-48.
197. Sacconi, S., S. Pantano, and G. Natoli, *Two waves of nuclear factor kappaB recruitment to target promoters.* J.Exp.Med., 2001. **193**(12): p. 1351-1359.
198. Medzhitov, R. and T. Horng, *Transcriptional control of the inflammatory response.* Nat.Rev.Immunol., 2009. **9**(10): p. 692-703.
199. Natoli, G. and J.C. Andrau, *Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models.* Annu.Rev.Genet., 2012. **46**: p. 1-19.
200. Heintzman, N.D., et al., *Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression.* Nature, 2009. **459**(7243): p. 108-112.
201. Zhang, B., et al., *A dynamic H3K27ac signature identifies VEGFA-stimulated endothelial enhancers and requires EP300 activity.* Genome Res, 2013. **23**(6): p. 917-27.
202. Kornberg, R.D., *The molecular basis of eucaryotic transcription.* Cell Death Differ, 2007. **14**(12): p. 1989-97.
203. Levine, M., C. Cattoglio, and R. Tjian, *Looping Back to Leap Forward: Transcription Enters a New Era.* Cell, 2014. **157**(1): p. 13-25.
204. Roeder, R.G., *Nuclear RNA polymerases: role of general initiation factors and cofactors in eukaryotic transcription.* Methods Enzymol, 1996. **273**: p. 165-71.
205. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions.* Genes Dev., 2012. **26**(3): p. 203-234.
206. Hargreaves, D.C., T. Horng, and R. Medzhitov, *Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation.* Cell, 2009. **138**(1): p. 129-45.
207. Danko, C.G., et al., *Signaling pathways differentially affect RNA polymerase II initiation, pausing, and elongation rate in cells.* Mol Cell, 2013. **50**(2): p. 212-22.
208. Gilchrist, D.A., et al., *Regulating the regulators: the pervasive effects of Pol II pausing on stimulus-responsive gene networks.* Genes Dev, 2012. **26**(9): p. 933-44.
209. Sims, R.J., 3rd, R. Belotserkovskaya, and D. Reinberg, *Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it.* Genes Dev, 2004. **18**(20): p. 2437-68.
210. Hacker, H. and M. Karin, *Regulation and function of IKK and IKK-related kinases.* Sci.STKE., 2006. **2006**(357): p. re13.
211. Ghisletti, S. and G. Natoli, *Deciphering cis-regulatory control in inflammatory cells.* Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci., 2013. **368**(1620): p. 20120370.
212. Zaret, K.S. and J.S. Carroll, *Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression.* Genes Dev, 2011. **25**(21): p. 2227-41.

213. Gualdi, R., et al., *Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control*. Genes Dev, 1996. **10**(13): p. 1670-82.
214. Angelov, D., et al., *The histone octamer is invisible when NF-kappaB binds to the nucleosome*. J Biol Chem, 2004. **279**(41): p. 42374-82.
215. Bartke, T., et al., *Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation*. Cell, 2010. **143**(3): p. 470-84.
216. Goto, A., et al., *Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 97-104.
217. Nickles, D., et al., *A genome-wide RNA interference screen identifies caspase 4 as a factor required for tumor necrosis factor alpha signaling*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(17): p. 3372-81.
218. Valanne, S., et al., *Genome-wide RNA interference in Drosophila cells identifies G protein-coupled receptor kinase 2 as a conserved regulator of NF-kappaB signaling*. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 6188-98.
219. Warner, N., et al., *A genome-wide siRNA screen reveals positive and negative regulators of the NOD2 and NF-kappaB signaling pathways*. Sci.Signal., 2013. **6**(258): p. rs3.
220. Chew, J., et al., *WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(5): p. 659-66.
221. Li, S., et al., *RNAi screen in mouse astrocytes identifies phosphatases that regulate NF-kappaB signaling*. Mol Cell, 2006. **24**(4): p. 497-509.
222. Metzigg, M., et al., *An RNAi screen identifies USP2 as a factor required for TNF-alpha-induced NF-kappaB signaling*. Int J Cancer, 2011. **129**(3): p. 607-18.
223. Lim, C.A., et al., *Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF-kappaB upon TLR4 activation*. Mol Cell, 2007. **27**(4): p. 622-35.
224. Birmingham, A., et al., *Statistical methods for analysis of high-throughput RNA interference screens*. Nat Methods, 2009. **6**(8): p. 569-75.
225. Zhang, J.H., T.D. Chung, and K.R. Oldenburg, *A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays*. J Biomol Screen, 1999. **4**(2): p. 67-73.
226. Jensen, L.J., et al., *STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D412-6.
227. Mukherjee, S.P., et al., *Analysis of the RelA:CBP/p300 interaction reveals its involvement in NF-kappaB-driven transcription*. PLoS.Biol., 2013. **11**(9): p. e1001647.
228. Greer, E.L. and Y. Shi, *Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(5): p. 343-57.
229. Chen, S. and Y. Shi, *A new horizon for epigenetic medicine?* Cell Res, 2013. **23**(3): p. 326-8.
230. De Santa, F., et al., *The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing*. Cell, 2007. **130**(6): p. 1083-94.
231. De Santa, F., et al., *Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages*. EMBO J, 2009. **28**(21): p. 3341-52.
232. Kruidenier, L., et al., *A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response*. Nature, 2012. **488**(7411): p. 404-8.
233. Shilatifard, A., *The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 65-95.
234. Hagiwara, T., et al., *Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(3): p. 979-83.
235. Cuthbert, G.L., et al., *Histone deimination antagonizes arginine methylation*. Cell, 2004. **118**(5): p. 545-53.
236. Wang, Y., et al., *Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination*. Science, 2004. **306**(5694): p. 279-83.
237. Denis, H., et al., *Functional connection between deimination and deacetylation of histones*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(18): p. 4982-93.

238. Li, P., et al., *Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(15): p. 4745-58.
239. Zhang, X., et al., *Genome-wide analysis reveals PADI4 cooperates with Elk-1 to activate c-Fos expression in breast cancer cells*. PLoS Genet, 2011. **7**(6): p. e1002112.
240. Hoberg, J.E., et al., *IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(2): p. 457-71.
241. Lee, S.K., et al., *Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12470-4.
242. Zhou, R., et al., *miR-16 targets transcriptional corepressor SMRT and modulates NF-kappaB-regulated transactivation of interleukin-8 gene*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30772.
243. Perissi, V., et al., *Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(2): p. 109-23.
244. Ashburner, B.P., S.D. Westerheide, and A.S. Baldwin, Jr., *The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(20): p. 7065-77.
245. Guenther, M.G., O. Barak, and M.A. Lazar, *The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): p. 6091-101.
246. Jepsen, K., et al., *Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development*. Cell, 2000. **102**(6): p. 753-63.
247. Zupkovitz, G., et al., *Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 7913-28.
248. Meyer, M.B. and J.W. Pike, *Corepressors (NCoR and SMRT) as well as coactivators are recruited to positively regulated 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-responsive genes*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2013. **136**: p. 120-4.
249. Peterson, T.J., et al., *The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) corepressor is required for full estrogen receptor alpha transcriptional activity*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(17): p. 5933-48.
250. Berghagen, H., et al., *Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor T3Ralpha from a negative hormone response element*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49517-22.
251. Wang, Z., et al., *Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes*. Cell, 2009. **138**(5): p. 1019-31.
252. Kelly, R.D. and S.M. Cowley, *The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: complex co-stars with multiple leading parts*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(3): p. 741-9.
253. Vermeulen, M., et al., *A feed-forward repression mechanism anchors the Sin3/histone deacetylase and N-CoR/SMRT corepressors on chromatin*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(14): p. 5226-36.
254. Jelinic, P., J. Pellegrino, and G. David, *A novel mammalian complex containing Sin3B mitigates histone acetylation and RNA polymerase II progression within transcribed loci*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(1): p. 54-62.
255. Goodrich, J.A. and R. Tjian, *Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(8): p. 549-58.
256. Kelly, W.G., M.E. Dahmus, and G.W. Hart, *RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc*. J Biol Chem, 1993. **268**(14): p. 10416-24.
257. Lewis, B.A. and J.A. Hanover, *O-GlcNAc and the Epigenetic Regulation of Gene Expression*. J Biol Chem, 2014. **289**(50): p. 34440-34448.
258. Wells, L., K. Vosseller, and G.W. Hart, *Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2376-8.
259. Dahmus, M.E., *Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19009-12.
260. Golks, A., et al., *Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation*. EMBO J, 2007. **26**(20): p. 4368-79.

261. Yang, W.H., et al., *NF-kappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(45): p. 17345-50.
262. Xing, D., et al., *O-GlcNAc modification of NF-kappaB p65 inhibits TNF-alpha-induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24021.
263. Hwang, S.Y., et al., *O-GlcNAc transferase inhibits LPS-mediated expression of inducible nitric oxide synthase through an increased interaction with mSin3A in RAW264.7 cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(6): p. C601-8.
264. Li, Y., et al., *Chitosan oligosaccharides block LPS-induced O-GlcNAcylation of NF-kappaB and endothelial inflammatory response*. Carbohydr Polym, 2014. **99**: p. 568-78.
265. Le Guezennec, X., M. Vermeulen, and H.G. Stunnenberg, *Molecular characterization of Sin3 PAH-domain interactor specificity and identification of PAH partners*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(14): p. 3929-37.
266. van Ingen, H., et al., *Role of structural and dynamical plasticity in Sin3: the free PAH2 domain is a folded module in mSin3B*. J Mol Biol, 2006. **358**(2): p. 485-97.
267. Hassig, C.A., et al., *Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A*. Cell, 1997. **89**(3): p. 341-7.
268. Icardi, L., et al., *The Sin3a repressor complex is a master regulator of STAT transcriptional activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(30): p. 12058-63.
269. Wong, C.W. and M.L. Privalsky, *Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5500-10.
270. Foglietti, C., et al., *Dissecting the biological functions of Drosophila histone deacetylases by RNA interference and transcriptional profiling*. J Biol Chem, 2006. **281**(26): p. 17968-76.
271. Helin, K. and D. Dhanak, *Chromatin proteins and modifications as drug targets*. Nature, 2013. **502**(7472): p. 480-8.
272. Nicodeme, E., et al., *Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1119-23.
273. Filippakopoulos, P., et al., *Selective inhibition of BET bromodomains*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1067-1073.
274. Dawson, M.A., et al., *Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia*. Nature, 2011. **478**(7370): p. 529-33.
275. Delmore, J.E., et al., *BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc*. Cell, 2011. **146**(6): p. 904-17.
276. Brown, J.D., et al., *NF-kappaB Directs Dynamic Super Enhancer Formation in Inflammation and Atherogenesis*. Mol.Cell, 2014. **56**(2): p. 219-231.

7.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Nomenklatur und Funktionen der IL-1 Familie.....	10
Abb. 1:	IL-1-induzierte Signalwege.....	12
Abb. 2:	Aufbau von p65, p50 und Ikbα.....	14
Abb.3:	Wichtige Schritte der Regulation von NF-κB.....	19
Abb. 4:	Aufbau und Interaktionspartner von Sin3.....	20
Abb. 5:	Ausgangssituation zu Beginn der Arbeit.....	24
Abb. 6:	Vergleichende Microarray-Analysen von in dieser Arbeit verwendeten Zellsystemen für die 50 am stärksten IL-1-induzierten Gene.....	60
Abb. 7:	Lokalisation der CHIP-PCR Regionen an den humanen <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci.....	62

Abb. 8:	NF- κ B p65 spielt eine essentielle Rolle für die Rekrutierung von Ko-Faktoren an die <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci und für die <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> mRNA Expression...63
Abb. 9:	Essentielle Rolle von p65 für die IL-1-abhängige Acetylierung von H3K27 an den <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci.....65
Abb. 10:	Charakterisierung von zwei zusätzlichen p65-abhängigen intergenischen Enhancern.....66
Abb. 11:	Die Hemmung von IKK2 beeinflusst die nukleäre Lokalisation von p65 und die IL-1-induzierte H3K27 Acetylierung und Chemokinexpression.....68
Abb. 12:	Relative Effekte einer pharmakologischen TAK1- bzw. IKK2-Hemmung auf die IL-1-abhängige H3K27 Acetylierung an den <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci.....70
Abb. 13:	Einfluss einer Suppression der TAK1 Proteinmenge auf die IL-1-abhängige Acetylierung von H3K27 und die Genexpression an den <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci.....71
Abb. 14:	c-Fos und JunD haben wenig Einfluss auf die IL-1-abhängigen Effekte an den <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci.....72
Abb. 15:	TAK1 und NF- κ B p65 sind im Gegensatz zu c-Fos und JunD wichtige Komponenten eines IL-1-regulierten Signalweges, der zur H3K27 Acetylierung an den <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Loci führt.....73
Abb. 16:	Zusammenfassende schematische Darstellung von NF- κ B p65 als Masterregulator an IL-1-induzierbaren Genen.....74
Abb. 17:	Expressionkinetik von IL-1-induzierbaren Zielgenen in murinen embryonalen Fibroblasten (TA7).....76
Abb. 18:	Auswahl der IL-1 Zielgene und „Haushaltsgene“ für das spätere RNAi-Screening.....77
Abb. 19:	Durchführung des Screening-Assays.....78
Abb. 20:	Darstellung der in Screen I und II gemessenen Werte.....79
Abb. 21:	Darstellung der dCt und ddCt-Werte aus Screen I und II.....80
Tab. 2:	Die <i>knockdowns</i> von sechzehn ausgewählten Ko-Regulatoren zeigten eine mindestens 4-fache Verminderung der <i>mCxc12</i> mRNA.....81
Abb. 22:	Validierung der Screening Ergebnisse für 16 ausgewählte Ko-Regulatoren und Expressionsanalysen weiterer IL-1 Zielgene.....82
Abb. 23:	Differentieller Einfluss der Depletion von mSin3a auf die IL-1-induzierbare Genexpression.....83
Abb. 24:	Einfluss von mSin3a auf die p65 Proteinmenge in murinen embryonalen Fibroblasten.....85
Abb. 25:	Zusammenfassende schematische Darstellung der im RNAi-Screening ermittelten Ko-Aktivatoren auf das IL-1 Zielgen <i>mCxc12</i>86
Abb. 26:	IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a an die <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i> Promotoren in humanen KB Zellen.....87
Abb. 27:	IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a an den <i>mCcl2</i> Promotor in murinen embryonalen Fibroblasten.....90
Abb. 28:	Die Sin3a Rekrutierung ist TAK1-abhängig.....91
Abb. 29:	Die Sin3a Rekrutierung ist IKK2-abhängig.....93
Abb. 30:	Die Hemmung von Klasse I und II HDACs durch TSA beeinflusst die Sin3a Rekrutierung nicht.....94
Abb. 31:	Überblick über die Gesamtzahl an ChIP-seq Reads/Peaks und Anzahl der überlappenden Peaks von Sin3a, Pol II, P(S5)-Pol II und p65.....95
Abb. 32:	Identifizierung einer Gruppe an IL-1-regulierten Sin3a Peaks.....97

Abb. 33:	Verteilung genomischer Elemente über Regionen mit signifikanter konstitutiver vs. IL-1-induzierter Sin3a Bindung.....	98
Abb. 34:	Durchschnittliche Verteilung der Sin3a Bindung über den genomischen Regionen der in KB Zellen exprimierten Gene.....	98
Abb. 35:	Korrelation der relativen Chromatinbindung von Sin3a, P(S5)-Pol II und Pol II mit der mRNA Expression.....	99
Abb. 36:	Genomweite Korrelationsanalyse von mRNA Expression und Sin3a Bindung	100
Abb. 37:	Korrelationsanalyse aller Quartil-normalisierten <i>read counts</i> für Sin3a, P(S5)-Pol II und Pol II unter den vier Behandlungsbedingungen.....	101
Abb. 38:	ChIP-seq Analyse von Sin3a am CXC-Cluster auf Chromosom 4.....	103
Abb. 39:	Zusammenfassende schematische Darstellung der IL-1-abhängigen Sin3a Rekrutierung an aktivierte NF-κB Zielgene.....	105
Abb. 40:	Kinetische Analyse der IL-1-induzierten Rekrutierung von p65, P(S5)-Pol II und Sin3a.....	106
Abb. 41:	p65 ist essentiell für die IL-1-abhängige Rekrutierung von Sin3a.....	107
Abb. 42:	Schematische Darstellung von drei Arbeitsmodellen zur Hierarchie der Rekrutierungsereignisse an IL-1-induzierten NF-κB Zielgenen	109
Abb. 43:	Sin3a reprimiert die Expression der IL-1 Zielgene <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i>	110
Abb. 44:	Die Überexpression von p65 führt zu einer gesteigerten Rekrutierung von Sin3a.....	111
Abb. 45:	Die Überexpression von Sin3a besitzt kaum Einfluss auf die Rekrutierungsereignisse und die IL-1-abhängige Genexpression von <i>IL8</i> und <i>CXCL2</i>	112
Tab. 3:	Überblick über verwendete Transkriptionsinhibitoren und deren Eigenschaften	113
Abb. 46:	Actinomycin D blockiert die Rekrutierung von p65, RNA-Pol II und Sin3a...	113
Abb. 47:	DRB hemmt die Transkriptionselongation durch RNA-Pol II und vermindert die Sin3a Rekrutierung.....	114
Abb. 48:	α-Amanitin reduziert die RNA-Pol II Bindung und hemmt die Sin3a Rekrutierung.....	115
Abb. 49:	Zusammenfassende schematische Darstellung der hierarchischen Bindungsereignisse von p65, RNA-Pol II und Sin3a an NF-κB Zielgenen....	116
Abb. 50:	Expression von verkürzten Sin3a-Konstrukten.....	118
Abb. 51:	IL-1-unabhängige Interaktion von p65 und Sin3a.....	119
Abb. 52:	Interaktion von Sin3a und p65.....	120
Abb. 53:	IL-1-unabhängige Interaktion von Sin3a mit p65 und RNA-Pol II am Chromatin	121
Abb. 54:	Interaktionen zwischen den sechzehn potentiellen Ko-Regulatoren und p65 (RelA).....	128
Abb. 55:	Schematische Darstellung der in dieser Arbeit charakterisierten molekularen Mechanismen der Chromatin-abhängigen Regulation inflammatorischer Gene.....	137

7.3 shRNA-Verzeichnis der Screening Kandidaten

Eine Liste aller verwendeten shRNA-Plasmide aus der TRC1 Bibliothek wurde auf der beigefügten DVD hinterlegt.

7.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
as	<i>antisense</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
ChIP-seq	ChIP-Sequenzierung
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphate
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazol 1-β-D-ribofuranosid
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase

H3K9ac	Acetylierung des Lysins K9 am Histon H3
H3K27ac	Acetylierung des Lysins K27 am Histon H3
H3K4me1	Monomethylierung des Lysins K4 am Histon H3
H3K9me3	Trimethylierung des Lysins K9 am Histon H3
H3K27me3	Trimethylierung des Lysins K27 am Histon H3
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin-1
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
m	mol
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	nano
NP40	<i>Nonidet P-40</i>
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
pSP	pSuper.puro
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ra	Rezeptor-Antagonist
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>ribonucleic acid interference</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	reverse Transkription
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
se	<i>sense</i>

sh	<i>short-hairpin</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit Tween 20
TE	Tris mit EDTA
TEMED	N, N', N'-Tetramethyldiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Units; Enzymeinheit
V	Volt
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
x g	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
μ	Mikro

7.5 PhD Portfolio

Name of PhD student: Johanna Soelch

Affiliation:

Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Schubertstr. 81

D-35392 Gießen

Start of PhD work: 01.06.2010

Topic of PhD thesis work:

Chromatinfaktoren und Mechanismen der Interleukin-1-abhängigen Genregulation

(Chromatin factors and mechanisms of interleukin-1-dependent gene regulation)

Thesis committee:

1. Prof. Dr. Michael Kracht (Supervisor)
2. Prof. Dr. Reinhard Dammann
3. Prof. Dr. Lienhard Schmitz

Meetings of the thesis committee:

TRR81 Seminar (07.04.2011)
 Joint Lab Meeting (16.09.2011)
 TRR81 Seminar (05.04.2012)
 Joint Lab Meeting (14.09.2012)
 TRR81 Seminar (04.04.2013)
 Joint Lab Meeting (15.02.2013)
 Joint Lab Meeting (27.09.2013)
 TRR81 Seminar (12.06.2014)
 Joint Lab Meeting (20.02.2015)

General courses/workshops

Leica microscopy workshop (Marburg 09.-11.10.2012)

NF-kB workshop Rauischholzhausen (01.-03.10.2012)

Seminars/journal club

1. progress report AG Seminar (RBI, 20.09.2010)

1. progress report RBI Seminar (RBI, 09.12.2010)

2. progress report AG Seminar (RBI, 31.01.2011)

TRR81 Seminar (07.04.2011)

“Establishment of a shRNA-based screen for nuclear co-regulators of IL-1-mediated gene expression”

3. progress report AG Seminar (RBI, 18.04.2011)

2. progress report RBI Seminar (RBI, 26.05.2011)

4. progress report AG Seminar (RBI, 18.07.2011)

3. progress report RBI Seminar (RBI, 10.11.2011)

5. progress report AG Seminar (RBI, 06.02.2012)

TRR81 Seminar (05.04.2012)

“Identification of novel co-regulators for IL-1-mediated gene expression by shRNA-based screens”

6. progress report AG Seminar (RBI, 23.04.2012)

4. progress report RBI Seminar (RBI, 03.05.2012)

7. progress report AG Seminar (RBI, 10.09.2012)

5. progress report RBI Seminar (RBI, 08.11.2012)

8. progress report AG Seminar (RBI, 10.12.2012)

Joint lab meeting AG Schmitz/AG Kracht Biochemie Gießen (15.02.2013)

„Identification of novel co-regulators for IL-1-mediated gene expression by shRNA-based screens”

9. progress report AG Seminar (RBI, 25.02.2013)

6. progress report RBI Seminar (RBI, 14.03.2013)

TRR81 Seminar (04.04.2013)

“Co-activating functions of co-repressors in cytokine signaling”

10. progress report AG Seminar (RBI, 27.05.2013)

7. progress report RBI Seminar (RBI, 17.10.2013)

11. progress report AG Seminar (RBI, 21.10.2013)

8. progress report RBI Seminar (RBI, 16.01.2014)

12. progress report AG Seminar (RBI, 10.02.2014)

13. progress report AG Seminar (RBI, 05.05.2014)

TRR81 Seminar (12.06.2014)

“Coactivator functions of Sin3a”

14. progress report AG Seminar (RBI, 10.11.2014)

15. progress report AG Seminar (RBI, 15.03.2015)

Chromatin Methods Club:

- RNAi/Planning a RNAi screen (IMT Marburg, 20.09.2011)

Retreats:

- Ganymed Pharmaceuticals (Mainz, 22.06.2011)

(Inter)national conferences

Transregio 81 Symposium "*Chromatin Changes in Differentiation and Malignancies*" Gießen
Sep. 2012

Transregio 81 Symposium "*Chromatin Changes in Differentiation and Malignancies*" Egmond
aan Zee, Sep. 2013

Others

Supervising master thesis: Juliane Kums

„Untersuchungen der NF- κ B p65 Rekrutierung an das Chromatin und des Chromatinstatus
p65-abhängiger Gene in murinen embryonalen Fibroblasten“

(Okt. 2012-Apr. 2013)

Supervising master thesis: Beatrice Pflüger

„Untersuchung der Rekrutierung von AP-1 und der Veränderung des Chromatinstatus am
CXC- Cluster in Abhängigkeit von Interleukin-1“

(Sep. 2013-Apr. 2014)

7.6 Publikationen

Jurida L.¹, Soelch J.¹, Bartkuhn M.¹, Handschick K., Müller H., Newel D., Weber A., Dittrich-Breiholz O., Schneider H., Bhujra S., Saul V.V., Schmitz M.L., Kracht M. (2015).

The activation of IL-1-induced enhancers depends on TAK1 kinase activity and NF- κ B p65. Cell Reports 10(5): 726-739.

¹gleichwertige Autorenschaft

- Abbildung 4A: Durchführung der P(S5)-Pol II ChIP-seq Experimente in Zusammenarbeit mit Doris Newel
- Abbildung 4C/D: Durchführung der ChIP-seq Experimente in KB Zellen nach PHA-408 Behandlung und mRNA-Analyse
- Abbildung 5: Durchführung und Analyse der gezeigten ChIP-Experimente, mRNA-Analysen und Westernblots; Design von neuen Primer-Paaren; Erzeugung von Abbildungen
- Abbildung 6A/B: Durchführung und Analyse der ChIP-Experimente in Zusammenarbeit mit Liane Jurida; Erzeugung von Abbildungen
- Abbildung 6C: Erzeugung von Abbildungen
- Abbildung 7B-E: Durchführung und Analyse der gezeigten ChIP-Experimente und mRNA-Analysen in Zusammenarbeit mit Dr. Katja Handschick und Doris Newel; Erzeugung von Abbildungen
- Abbildung S2: Durchführung der P(S5)-Pol II ChIP-seq Experimente in Zusammenarbeit mit Doris Newel
- Abbildung S5: Durchführung und Analyse der gezeigten ChIP-Experimente; Design von neuen Primer-Paaren; Erzeugung von Abbildungen
- Abbildung S6: Durchführung und Analyse der gezeigten ChIP-Experimente, mRNA-Analysen und Westernblots in Zusammenarbeit mit Dr. Katja Handschick und Doris Newel; Erzeugung von Abbildungen
- Abbildung S7: Durchführung und Analyse der gezeigten ChIP-Experimente in Kooperation mit Liane Jurida, Dr. Katja Handschick und Doris Newel; Erzeugung von Abbildungen

Allgemeine Planung, Durchführung, Auswertung und Darstellung von Experimenten während der Revision.

Handschick, K., Beuerlein, K., Jurida, L., Bartkuhn, M., Müller, H., Soelch, J., Weber, A., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Scharfe, M., Jarek, M., Stellzig, J., Schmitz, M.L., Kracht, M. (2014)

Cyclin-Dependent Kinase 6 is a Chromatin-Bound Cofactor for NF-kappaB-Dependent Gene Expression. Mol Cell. 53(2):193-208.

Abbildung 6E: Etablierung eines p65-*knockdowns* mittels shRNA in HeLa Zellen; Durchführung und Analyse der gezeigten ChIP-Experimente, mRNA-Analysen und Westernblots; Erzeugung von Abbildungen

Abbildung 6F: Durchführung und Analyse der gezeigten ChIP-Experimente in Zusammenarbeit mit Liane Jurida

Weitere nicht gezeigte ChIP-Analysen zur Rekonstitution von CDK6 in CDK6-defizienten Zellen. Allgemeine Mitwirkung bei der Durchführung und Analyse von Experimenten während der Revision.

Ziesché, E., Kettner-Buhrow, D., Weber, A., Wittwer, T., Jurida, L., Soelch, J., Müller, H., Newel, D., Kronich, P., Schneider, H., Dittrich-Breiholz, O., Bhaskara, S., Hiebert, S.W., Hottiger, M.O., Li, H., Burstein, E., Schmitz, M.L., Kracht, M. (2013)

The coactivator role of histone deacetylase 3 in IL-1-signaling involves deacetylation of p65 NF-κB. Nucleic Acids Research 41(1): 90-109.

Abbildung 2B: mRNA-Analyse von Tamoxifen-induzierten HDAC3 *-/- knockout* MEFs nach Stimulation mit IL-1

Abbildung S2: mRNA-Analyse von Tamoxifen-behandelten Kontroll-MEF Zelllinien nach Stimulation mit IL-1

Abbildung S3: RNAi-vermittelter *knockdown* von HDAC3 in MEFs mit anschließender mRNA-Analyse

Abbildung S6: Probengenerierung für Microarray-Experimente

Abbildung S10: RNAi-vermittelter *knockdown* von HDAC1 und 2 in MEFs mit anschließender mRNA-Analyse

Abbildung S11: mRNA-Analyse von Tamoxifen-induzierten HDAC3 *-/- knockout* MEFs nach Stimulation mit TNF und Probengenerierung für Microarray-Experimente

7.7 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Michael Kracht für die Möglichkeit meine Dissertation am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie anfertigen zu dürfen, für die motivierte Betreuung und sein stets großes Engagement beim Gelingen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Dammann danke ich für die bereitwillige Vertretung vor dem Fachbereich Biologie, sowie für die kompetente Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Lienhard Schmitz und Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Braun danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit, sowie für die freundliche Bereitschaft an meiner Disputation teilzunehmen.

Bei Dr. Marek Bartkuhn und Dr. Axel Weber möchte ich mich für ihr Engagement bei der Analyse der genomweiten Daten bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an alle Kollegen des RBI, auf deren Unterstützung man sich immer verlassen konnte und die stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Ganz ausdrücklich möchte ich mich bei meinen beiden Kolleginnen Liane und Katja für ihre Freundschaft und die schöne gemeinsame Zeit bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich immer und mit ganzer Kraft in meinen Plänen unterstützt haben und deren liebevoller Rückhalt vieles ermöglicht hat.

Von Herzen bedanke ich mich bei meinem Freund Bernd, der in jeder Hinsicht immer für mich da ist! Vielen Dank dafür!!!

7.8 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

(Johanna Sölch)